



UNIVERSIDAD DE CORDOBA
UNIVERSIDAD DEL ZULIA
DOCTORADOS EN CONJUNTO
PROGRAMA DE BIOTECNOLOGÍA AGRARIA



TESIS DOCTORAL

Embriogénesis Somática en Guayabo (*Psidium guajava* L.)

Doctorando:

A handwritten signature in blue ink, likely belonging to Jorge Alberto Vilchez Perozo.

Ing. Agr. MSc. Jorge Alberto Vilchez Perozo

DIRECTORES:

Dra. Carolina Sánchez Romero
UMA-ESPAÑA

Dr. Fernando Pliego Alfaro
UMA-ESPAÑA

TUTOR:

Dr. Luís Miguel Martín

Maracaibo, Venezuela - Noviembre de 2015

TITULO: *Embriogénesis somática en Guayabo (Psidium Guajava L.)*

AUTOR: *Jorge Alberto Vílchez Perozo*

© Edita: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba. 2016
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

www.uco.es/publicaciones
publicaciones@uco.es

Embriogénesis Somática en Guayabo (*Psidium guajava* L.)

Jorge Alberto Vilchez Perozo

C.I.: V-10.917.803

Fdo.: 

Urbanización La Trinidad, calle 55, avenida 15 (Delicias),

Edificio Vértice, apartamento 1-I. Municipio Maracaibo, Estado Zulia.

Teléfonos: 58-261-7428097, 58-412-1736426.

Correo electrónico: jvilchezp@fa.luz.edu.ve



TÍTULO DE LA TESIS: Embriogénesis Somática en Guayabo (*Psidium guajava* L.)

DOCTORANDO/A: Jorge Alberto Vilchez Perozo

INFORME RAZONADO DEL/DE LOS DIRECTOR/ES DE LA TESIS


(se hará mención a la evolución y desarrollo de la tesis, así como a trabajos y publicaciones derivados de la misma).


La tesis representa un avance considerable en el conocimiento de las bases fisiológicas del proceso de embriogénesis somática en *Psidium guajava* L. Se han optimizado las fases de inducción y proliferación de callo embriogénico a partir de embriones zigóticos, habiéndose mejorado también el proceso de germinación mediante el uso de recipientes RITA. Por otra parte, el crecimiento de las plántulas obtenidas in vitro fue superior al de las plantas derivadas de semilla, al finalizar el periodo de aclimatación. La tesis está bien presentada y los resultados se han discutido adecuadamente; por tanto, puede ser presentada para su defensa. La calidad de esta investigación viene avalada por las dos publicaciones, derivadas de ella, en revistas de ámbito internacional.

Por todo ello, se autoriza la presentación de la tesis doctoral.

Córdoba, 14 de Octubre de 2015

Firma del/de los director/es


Edo. Fernando Pliego Alfaro


Fdo.: Carolina Sanchez Romero

**TÍTULO DE LA TESIS:**

Embriogénesis Somática en guayabo (*Psidium guajava* L.)

DOCTORANDO/A:

Jorge Alberto Vilchez Perozo

ESCRITO RAZONADO DEL RESPONSABLE DE LA LÍNEA DE INVESTIGACIÓN

(Ratificando el informe favorable del director. Sólo cuando el director no pertenezca a la Universidad de Córdoba).

La Tesis ha sido dirigida por dos prestigiosos especialistas en el área de cultivo de tejidos, herramienta de gran valor para los programas de mejora genética vegetal. En dicha Tesis se ha conseguido avances importantes en el conocimiento de la embriogénesis del Guayabo, que repercutirán de forma positiva en los procesos de su mejora genética. Los resultados están adecuadamente presentados. Estas consideraciones me llevan a ratificar el informe favorable para su presentación efectuado por los Directores.

Por todo ello, se autoriza la presentación de la tesis doctoral.

Córdoba, 11 de noviembre de 2015

Firma del responsable de línea de investigación

Fdo.: Luis Miguel Martín Martín

AGRADECIMIENTOS

En la elaboración de esta Tesis Doctoral han estado involucradas una serie de personas e instituciones a las cuales quisiera transmitir mi más sincero agradecimiento, especialmente a:

A Dios haberme permitido cumplir una meta más en mi vida, que aunque no fue fácil, "Dios aprieta pero no ahoga, aunque a veces nos deja sin aliento".

A Nilca, Adrián y Andrés por siempre estar allí para apoyarme sin restricción durante toda esta travesía y perdonarme las veces que estuve ausente.

Al grupo de investigadores del laboratorio de Biotecnología "Profa. Silvia León de Sierralta" que de manera directa o indirecta contribuyeron a la realización de esta investigación, especialmente a las Dra. Alba Nava, Ing. Agr. Leonardo Martínez e Ing. Agr. Carlos Álvarez.

A mis amigos Anita, Razzela, Zenaida, Silvia, Jaquelin, Leyanis, Carlos y Miguel, por su apoyo y colaboración.

Al Dr. Enrique Sancho, mi profesor y amigo, gracias por sus pertinentes y sabios consejos.

A mi tutor Dr. Luis Martin y directores Dra. Carolina Sánchez y Dr. Fernando Pliego mil gracias porque a pesar de separarnos 7261,74 Km supieron estar presente.

A las instituciones, Vicerrectorado Académico de la Universidad del Zulia, Facultad de Agronomía, Consejo de Desarrollo Científico,

Humanístico y Tecnológico de la Universidad del Zulia, Centro de Investigación y Desarrollo Frutícola-Apícola del Zulia y Programa de Becas Misión Ciencia, por el cofinanciamiento de gran parte de esta investigación.

A la Universidad de Córdoba por acogerme en su seno para formarme académicamente.

A todos, mil gracias

ÍNDICE DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS.....	IV
ÍNDICE DE CONTENIDO	VI
RESUMEN.....	X
ABSTRACT.....	XII
I. INTRODUCCION Y OBJETIVOS	14
I.1. Introducción	14
I.2. Objetivos	18
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	19
II.1. Importancia del cultivo del guayabo.	19
II.2. Características botánicas del guayabo y principales cultivares en utilizados en Venezuela.....	20
II.2.1. Características botánicas del guayabo.	20
II.2.2. Principales cultivares utilizados en Venezuela.	21
II.3. Limitaciones de la propagación convencional del cultivo del guayabo.	23
II.4. Generalidades de la micropropagación.....	25
II.5. Generalidades sobre la embriogénesis somática.	28
II.5.1. Etapas de la embriogénesis somática.	29
II.5.1.1. Inducción de la embriogénesis somática.	29
II.5.1.2. Embriogénesis somática secundaria o repetitiva. ...	35
II.5.1.3. Germinación y conversión en plantas de los embriones somáticos.	36
II.6. Aumento de eficiencia de las fases de maduración y germinación: empleo de sistemas de inmersión temporal.	39
II.7. Crecimiento en vivero de las vitroplantas. Fase de aclimatación.	41
III. MATERIALES Y MÉTODOS	45
III.1. Material vegetal.	45
III.2. Procedimientos generales.	46
III.3. Estudios histológicos del proceso de embriogénesis somática en guayabo.	47

III.4. Técnicas de procesamiento y análisis de datos.....	47
III.5. Inducción de embriogénesis somática en guayabo.....	48
Experimento 1. Efecto de la auxina en la inducción de embriogénesis somática en guayabo a partir de embriones cigóticos inmaduros.	48
Experimento 2. Efecto del medio de cultivo y de la concentración de sacarosa en la inducción de embriogénesis somática en guayabo.....	49
III.6. Embriogénesis secundaria y establecimiento de suspensiones embriogénicas en guayabo.	50
Experimento 3. Efecto del 2,4-D y la L-glutamina en la multiplicación secundaria de embriones somáticos de guayabo.	50
Experimento 4. Establecimiento de suspensiones embriogénicas a partir de callos embriogénicos de guayabo. ..	52
Experimento 5. Efecto de la densidad de cultivo estimada como volumen de células sedimentadas sobre la cinética de crecimiento de suspensiones celulares embriogénicas de guayabo.	53
III.7. Maduración y germinación de embriones somáticos de guayabo.	56
Experimento 6. Efecto de la concentración del ácido abscísico sobre la maduración de embriones somáticos de guayabo.	56
Experimento 7. Efecto de la concentración de sacarosa y del medio de cultivo sobre la germinación de embriones somáticos de guayabo.	57
Experimento 8. Comparación de la germinación de embriones somáticos de guayabo en sistemas de inmersión temporal y en medio semisólido.	58
Experimento 9. Determinación de los parámetros tiempo y frecuencia de inmersión para la germinación de embriones somáticos de guayabo en sistemas de inmersión temporal.	60
Experimento 10. Efecto de la densidad de inóculo inicial de embriones somáticos sobre la germinación en sistemas de inmersión temporal.	61

Experimento 11. Comparación de la germinación de embriones de guayabo en sistemas de inmersión temporal y en envase de cultivo con ventilación forzada.	62
III.8. Conversión en plantas de los embriones somáticos de guayabo.	63
Experimento 12. Comparación del crecimiento en vivero de vitroplantas provenientes de embriogénesis somática y de plantas de semilla.	63
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	66
IV.1. Inducción de embriogénesis somática en guayabo	66
Experimento 1. Efecto de la auxina en la inducción de embriogénesis somática en guayabo a partir de embriones cigóticos inmaduros.	66
Experimento 2. Efecto del medio de cultivo y de la concentración de sacarosa en la inducción de embriogénesis somática en guayabo.....	74
IV.2. Embriogénesis secundaria y establecimiento de suspensiones embriogénicas en guayabo	78
Experimento 3. Efecto del 2,4-D y la L-glutamina en la multiplicación secundaria de embriones somáticos de guayabo.	78
Experimento 4. Establecimiento de suspensiones embriogénicas a partir de callos embriogénicos de guayabo. ..	84
Experimento 5. Efecto de la densidad de cultivo estimada como VCS sobre la cinética de crecimiento de suspensiones celulares embriogénicas de guayabo.	88
IV.3. Maduración y germinación de embriones somáticos de guayabo.	93
Experimento 6. Efecto de la concentración del ácido abscísico sobre la maduración de embriones somáticos de guayabo.	93
Experimento 7. Efecto de la concentración de sacarosa y del medio de cultivo sobre la germinación de embriones somáticos de guayabo.	96
Experimento 8. Comparación de la germinación de embriones somáticos de guayabo en sistemas de inmersión temporal y en medio semisólido.	99

Experimento 9. Determinación de los parámetros tiempo y frecuencia de inmersión para la germinación de embriones somáticos de guayabo en sistemas de inmersión temporal. ..	102
Experimento 10. Efecto de la densidad de inóculo inicial de embriones somáticos sobre la germinación en sistemas de inmersión temporal.	104
Experimento 11. Comparación de la germinación de embriones de guayabo en sistemas de inmersión temporal y en envase de cultivo con ventilación forzada.	106
IV.4. Conversión en plantas de los embriones somáticos de guayabo	108
Experimento 12. Comparación del crecimiento en vivero de vitroplantas provenientes de embriogénesis somática y de plantas semilla.	108
V. CONCLUSIONES	117
VI. RECOMENDACIONES	119
VII. LITERATURA CITADA.....	120
VIII. ÍNDICE DE FIGURAS	150
IX. ÍNDICE DE TABLAS	153
X. LISTADO DE ABREVIATURAS	155

RESUMEN

El guayabo (*Psidium guajava* L.) constituye la especie más valiosa del género *Psidium* y tiene un importante valor frutícola para Venezuela, Latinoamérica y Europa. La introducción de nuevos cultivares de guayabo en Venezuela, plantea la necesidad de su propagación acelerada y la embriogénesis somática puede ser una alternativa de interés; por ello, en este trabajo se planteó establecer un protocolo de multiplicación para esta especie mediante esta vía. En la fase de inducción y utilizando como explanto embriones cigóticos inmaduros, se estudió el efecto de la formulación mineral, auxina, y sacarosa, lográndose porcentajes de formación de callo, callo embriogénico y masas pro-embriogénicas de 100%, 59,6% y 36,3%, respectivamente, en medio MS suplementado con 1 m.L⁻¹ 2,4-D, 400 mg.L⁻¹ L-glutamina, 100 mg.L⁻¹ ácido ascórbico, 60 g.L⁻¹ sacarosa y 2,4 g.L⁻¹ Phytigel, como agente gelificante. La proliferación de callo embriogénico tuvo lugar en el mismo medio de inducción. Asimismo, se estudió el efecto de los medios de cultivo MS y WPM, y la densidad de inóculo (2,5%, 5% y 10% de volumen de células sedimentadas, VCS) en el establecimiento y proliferación de suspensiones celulares embriogénicas. En medio MS se observó mayor VCS y menor consumo de sacarosa. Por otra parte, con la densidad 2,5% VCS se logró la mayor acumulación de biomasa, duplicándose a los 21 días de cultivo; la fase estacionaria ocurrió después de 42 días.

Los estudios llevados a cabo en la fase de maduración mostraron un efecto negativo del ABA en el proceso. En relación con el porcentaje de germinación, se obtuvo un 64,16% en medio semisólido con la formulación MS al 50% de sus macroelementos y 55% en presencia de 50 g.L⁻¹ de sacarosa. Por otra parte, la germinación en RITA[®] fue superior a la obtenida en medio semisólido, pero en RITA[®] se observó un mayor número de embriones con germinación incompleta. La

frecuencia y tiempo de inmersión óptimos en los RITA®, para lograr mayor número de embriones con germinación normal, fue 12 h y 1-2 min, respectivamente. El uso de envases con ventilación forzada (ECCVF) mejoró la calidad de los embriones obtenidos e incrementó el porcentaje de germinación.

Finalmente, en aclimatación, se comparó el crecimiento de plántulas procedentes de semilla y vitroplantas. A los 28 días después del trasplante (ddt), las plántulas superaron a las vitroplantas en acumulación de peso seco y tasa de crecimiento; sin embargo, a los 70 ddt, las vitroplantas superaron a las plántulas en las variables evaluadas.

ABSTRACT

Guava (*Psidium guajava* L.) is the most valuable specie that belongs to *Psidium* genus, which is a very important fruit crop in Venezuela, Latin America and Europe. The introduction of new guava cultivars into Venezuela creates a need for a fast propagation technique and the somatic embryogenesis represents an interesting alternative, therefore, this study was aimed to establish a guava multiplication protocol through embryogenesis. In the induction stage, mineral, auxin and sucrose effects were determined using immature zygotic embryos as explants. The percentages of callus, embryogenic callus and pro-embryogenic mass were 100%, 59.6% and 36.3%, respectively, on MS medium supplemented with 1 m.L⁻¹ 2,4-D, 400 mg.L⁻¹ L-glutamine, 100 mg.L⁻¹ ascorbic acid, 60 g.L⁻¹ sucrose and 2,4 g.L⁻¹ Phytigel as a gelling agent. Embryogenic callus proliferation took place on induction medium. Likewise, MS and WPM salts and inoculum density (2.5%, 5% and 10% settled cell volume, SCV) effects on establishment and proliferation of embryogenic cell suspension cultures were studied. Higher SCV and less sucrose consumption were observed on MS medium. On the other hand, 2.5% SCV gave rise to higher biomass accumulation, which was doubled at 21 days after culture, the stationary phase occurred after 42 days.

The studies during the maturation stage showed a negative effect of ABA. Regarding the germination percentage, it was obtained 64.16% on semi-solid medium with 50% macronutrients of MS medium and 55% on 50 g.L⁻¹ sucrose. On the other hand, the germination was higher in RITA[®] compared to the one obtained on semi-solid medium, nonetheless a larger number of embryos with uncompleted germination was observed in RITA[®]. The optimum frequency and immersion time to reach higher number of embryos with normal germination were 12 h and 1-2 min, respectively. The use of vessels

with forced ventilation improved embryo quality and increased the germination percentage.

Finally, for acclimatization stage, growth of seedlings and vitroplants were compared. On day 28 after transplant (dat), dry weight and growth rate were higher for seedlings; however the vitroplants performed better than seedlings 70 dat.

I. INTRODUCCION Y OBJETIVOS

I.1. Introducción

El guayabo (*Psidium guajava* L.) se considera uno de los frutales tropicales de mayor importancia ya que su fruto, la guayaba, tiene un alto contenido en vitamina C, carbohidratos y sales minerales (Trujillo *et al.*, 2004; Hassimotto *et al.*, 2005). También es utilizado como materia prima agroindustrial y representa una importante inversión para el agronegocio del cultivo (Cañizares y Puesme, 2003, Joseph y Priya, 2011). Además tradicionalmente, diferentes partes de las plantas, como, frutos, hojas, raíces y corteza, se han utilizado en el tratamiento de la gastroenteritis, diarrea y disentería (Jaiswal y Amin, 1992; Lozoya *et al.*, 2002; Joseph y Priya, 2011; Mukilarasi *et al.*, 2015).

Dentro de los cultivares de guayabo, el cv. "Enana Roja Cubana EEA-1840" destaca por su porte bajo, como su nombre indica, follaje denso, ramas extendidas y hábito de crecimiento disperso. Tiene una copa de hasta 3 m de diámetro y una altura promedio de aproximadamente 2,7 m a los cinco años de edad. Es muy prolífero y la producción de frutos se inicia antes de los seis meses cuando es injertado y se señalan rendimientos de cerca de 70 Tm.ha⁻¹ en plantaciones de 5 años de edad, bajo cultivo intensivo con marco de plantación de 4,5 m x 1,5 m (Vento, 2011). Este cultivar fue introducido desde la República de Cuba a la República Bolivariana de Venezuela en el año 2007, en el marco del Convenio de Cooperación Cuba-Venezuela y se sembraron en el país lotes de prueba para su producción agrícola y propagación estando uno de estos lotes ubicado en el Centro Socialista de Investigación y Desarrollo Frutícola y Apícola (CESID FRUTICOLA-APICOLA) de la Corporación para el

Desarrollo de la región Zuliana (CORPOZULIA), en el municipio Mara, estado Zulia.

La introducción de este cultivar planteó la necesidad de desarrollar protocolos de propagación para su multiplicación acelerada. En general, la propagación convencional del guayabo presenta limitaciones relacionadas con el número de esquejes o vástagos que puede proporcionar un individuo elite o superior (Peña *et al.*, 1996). Este aspecto hace más lenta la introducción de nuevos cultivares a escalas productivas.

Teniendo en cuenta estos problemas y el significado que tiene este frutal tropical en la producción y exportación de alimentos, se han dedicado numerosos esfuerzos y recursos para aplicar técnicas biotecnológicas a este grupo de plantas (Litz y Jaiswal, 1991; Akhtar *et al.*, 2000). La mayoría de éstos trabajos estuvieron dirigidos a desarrollar procedimientos para la micropropagación, utilizando la organogénesis a partir de segmentos nodales y brotación axilar (Amin y Jaiswal 1987; 1988; 1989; Jaiswal y Amin, 1987; Singh *et al.*, 2002; Ali *et al.*, 2003; Concepción *et al.*, 2004; Mishra *et al.*, 2007; Ocampo y Nuñez, 2007; Rai *et al.*, 2009; Meghwal *et al.*, 2010). En la última década se ha estudiado la embriogénesis somática como método de regeneración de plantas en varios cultivares de guayabo (Chandra *et al.*, 2004; Chandra y Mishra., 2005; Rai *et al.*, 2007; Akhtar, 2012, 2013b; Kamle *et al.*, 2014), incluyendo el cv. "Enana Roja Cubana EEA-1840" (Vilchez *et al.* 2001, 2002 y 2004b).

En muchas investigaciones en especies leñosas enfatizan la embriogénesis somática como el método preferido para el mejoramiento genético y la multiplicación de germoplasma valioso (Gupta y Durzan, 1987; Litz y Gray, 1995). La regeneración de plantas de guayabo vía embriogénesis somática es un método

eficiente que facilita el escalado a nivel comercial, y puede acelerar el mejoramiento genético en esta especie, así como su transformación genética (Chandra *et al.*, 2004; Vilchez *et al.* 2004b; Rai *et al.*, 2010).

En la embriogénesis somática una de las fases críticas la constituye la inducción. Esta fase conlleva un cambio en el patrón de expresión génica y está relacionada con uno o varios factores estresantes, tales como la presencia de una auxina fuerte, como el 2,4-D, y un potencial osmótico bajo en el medio de cultivo, causado por un agente osmótico como la sacarosa (von Arnold *et al.*, 2002; Karami y Saidi, 2010). No obstante, la inducción exitosa de embriones somáticos y su posterior conversión en plantas viables no es rutina eficiente en el guayabo, por lo que estos factores, entre otros, requieren de estudios más extendidos.

Una particularidad de la embriogénesis somática es la capacidad de las células embriogénicas de proliferar en medios de cultivo líquidos, aspecto reportado en muy pocas Myrtaceae, como *Eucalyptus* spp. (Muralidharan y Mascarenhas, 1995; Watt *et al.*, 1999) y abordado para el guayabo por primera vez en esta Tesis Doctoral. Los cultivos líquidos ofrecen una serie de ventajas técnicas sobre los cultivos en medio sólido, como son una tasa de crecimiento más rápida, debido a una rápida absorción de nutrientes por las células y mayor tasa de reemplazo de nutrientes en la superficie celular por difusión y movimiento del líquido de la periferia (Gupta y Timmis, 2005). El sistema de cultivo en medio líquido es importante para la producción a gran escala de embriones somáticos en biorreactores, lo que permite la automatización de la producción de embriones somáticos y su uso comercial (Salaj *et al.*, 2007).

Dentro de las limitaciones de la embriogénesis somática como método de micropropagación están las bajas tasas de germinación y de conversión en plantas de los embriones somáticos. Estas limitaciones están directamente relacionadas con la pobre o poca calidad de los embriones somáticos, falta de adecuada maduración y baja tolerancia a la desecación (Gómez, 1998; Merkle, 1995). En este sentido, algunos investigadores han demostrado que el empleo de sistemas de inmersión temporal mejora la germinación de embriones somáticos en varias especies (Mallón *et al.*, 2012; Barbón *et al.*, 2014), lo cual se explica por el hecho de que estos sistemas combinan la ventilación del recipiente de cultivo con el contacto intermitente entre el medio de cultivo y los explantos (Etienne *et al.*, 1997b; Georgiev *et al.*, 2014). Los sistemas de inmersión temporal proporcionan un entorno óptimo para el crecimiento y diferenciación de los embriones somáticos, ya que con estos sistemas de cultivo se mejora la absorción de nutrientes, el intercambio gaseoso y se reduce la tensión mecánica, con lo que se minimizan los trastornos fisiológicos y se preserva la integridad morfológica de la planta (Steingroewer *et al.*, 2013), además de mejorar la sincronización del crecimiento de los embriones somáticos (Cabasson *et al.*, 1997; Tahardi *et al.*, 2003). Sin embargo, para lograr el éxito de la germinación de los embriones somáticos mediante el uso de sistemas de inmersión temporal, es necesaria la determinación de algunos parámetros del cultivo bajo el esquema de este tipo de sistemas, como son el tiempo y la frecuencia de inmersión, así como la densidad de inóculo, aspectos que se abordan en esta investigación.

La producción de plantas de guayabo mediante embriogénesis somática no es posible sin la conversión en plantas de los embriones somáticos, lo cual ocurre en la etapa de aclimatación a condiciones *ex vitro*. El proceso de aclimatación de las plántulas obtenidas por cultivo *in vitro* es muy complejo, sobre todo en especies leñosas, por

lo que el control estricto de las condiciones ambientales durante esta fase es determinante en un sistema de micropropagación (Hazarika, 2003). La mayoría de las investigaciones en esta fase se centran en estudiar las condiciones necesarias para lograr la conversión de las vitroplantas a condiciones *ex vitro*, pero no hacen mucho hincapié en el proceso fisiológico que implica la aclimatación. En el cultivo del guayabo no existe información que vaya más allá de describir muy someramente las prácticas agronómicas a aplicar en esta fase. Es por ello que en esta investigación se planteó una aproximación cuantitativa para entender el crecimiento de las vitroplantas de guayabo obtenidas vía embriogénesis somática en la etapa de vivero.

I.2. Objetivos

Dada la importancia nutricional, económica y en el campo de la medicina del cultivo del guayabo para nuestro país y Latinoamérica, así como la utilidad de la embriogénesis somática como método de propagación masiva de nuevos cultivares, se realizó la presente investigación, cuyos objetivos fueron:

- I. Inducir la embriogénesis somática en *P. guajava*.
- II. Establecer la multiplicación secundaria de los embriones somáticos.
- III. Obtener la germinación de embriones somáticos y su conversión en plantas.
- IV. Realizar un estudio histológico del proceso de embriogénesis somática en *P. guajava*.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

II.1. Importancia del cultivo del guayabo.

La familia Myrtaceae, cuenta con algo más de 3800 especies distribuidas en aproximadamente 133 géneros (Wilson *et al.*, 2001; Sytsma y Litt, 2002), siendo la mayoría de esas especies de interés forestal, otras de importancia medicinal y pocas especies producen frutos comestibles. El guayabo (*Psidium guajava* L.) es una de ellas, y constituye la más valiosa de todas las del género *Psidium* (Cañizares, 1968; Peña *et al.*, 1996).

El guayabo es oriundo de América Tropical y su centro de origen se ubica en un punto situado entre México y Perú. Su primer registro data de 1526 cuando el español Gonzalo Fernández de Oviedo y Valdéz reconoció a esta planta como guayabo y a su fruta como guayaba, empleando los vocablos con que los indígenas antillanos la denominaban (Cañizares, 1968). A partir de su descubrimiento, su distribución se agilizó de manera extraordinaria. El guayabo es un frutal que se encuentra en todas las zonas tropicales y subtropicales del planeta (Samson, 1986; Peña *et al.* 1996).

En Venezuela para el año 2008, el área estimada de cultivo de guayabo fue de 3500 ha con una producción de 55650 Tm y un rendimiento anual de 15,9 Tm.ha⁻¹ (Aular y Casares, 2011). La guayaba representa una importante inversión para los pequeños y medianos productores de Venezuela (Cañizares y Puesme., 2003), entre otras razones porque esta fruta se ubica entre las diez más populares, dada su gran aceptación como fruta fresca por su aporte nutricional, alto contenido en vitamina C, carbohidratos, fibra y sales minerales (Trujillo, 2004) y por su posibilidad de industrializarse (Aular y Casares, 2011) en forma de jugos, néctares, jaleas, pasta,

dulces tradicionales como los cascos de guayaba y bocadillos (Habiba *et al.*, 2008; Marquina *et al.*, 2008; Ordoñez y Vásquez, 2012). Además en los últimos años sus frutos y hojas se han estudiado para su uso en el campo de la medicina natural y tradicional en el tratamiento de la gastroenteritis, diarreas, disenterías (Joseph y Priya, 2011), trastornos cardiovasculares, hipertensión arterial, disminución de niveles de colesterol y de triglicéridos en sangre (Guo *et al.* 2013; Nair *et al.* 2013); así mismo, tiene un reconocido efecto sobre el sistema inmunitario, ya que obra contra el envejecimiento por su efecto antioxidante (Jiménez *et al.* 2001; Flores *et al.* 2013), lo cual ha brindado la posibilidad de confeccionar algunos fármacos de importancia en la prevención del cáncer (Feldmann *et al.*, 2007; Ryu *et al.*, 2012).

II.2. Características botánicas del guayabo y principales cultivos en utilizados en Venezuela.

II.2.1. Características botánicas del guayabo.

Según Vento (2011), las características botánicas comunes del guayabo son:

Tallo: puede alcanzar entre 2 y 9 m de altura, con un diámetro de hasta 30 cm, con tendencia a ramificarse profusamente, aún desde brotes radicales. Su consistencia es dura y leñosa.

Hojas: presentan pecíolo corto, son coriáceas, oblongas, elípticas y dispuestas en pares alternos a lo largo de las ramas. El tamaño es de 7,5 y 15 cm, en algunos casos presentan una fina pubescencia. La nervadura se distingue fácilmente y es mucho más pronunciada en el envés. Tienen un aroma característico al ser estrujadas.

Raíz: presenta buen desarrollo y ramificación, con poder de penetración, motivando que las plantas se desarrollen bien en la mayoría de los suelos. Aparentemente, las raíces del guayabo tienen un marcado efecto alelopático, es decir, inhiben el desarrollo de malezas debajo del árbol.

Flores: son blancas, grandes, pueden aparecer solitarias o formando grupos variables (dos ó tres), en el extremo de cada yema floral o brindilla. La floración puede mantenerse durante todo el año en función del manejo del cultivo y si las condiciones ambientales la favorecen.

Fruto: es una baya que se desarrolla a partir de un ovario compuesto de forma variada. Pueden ser redondeados, oblongos y piriformes y pesar hasta 400 g. La piel puede ser lisa y cérea, el color de la pulpa puede ser blanco, amarillo, rosado o rojo, con olor característico y textura variada. Los de mejor calidad la tienen suave y fina, otros la tienen arenosa. El sabor varía desde dulce, ácido y muy ácido, en pocos casos insípido. El número de semillas es variable desde 100 hasta 500 aproximadamente.

II.2.2. Principales cultivares utilizados en Venezuela.

La propagación natural del guayabo es por semilla, razón por la cual, a través de múltiples generaciones se dispone de una amplia diversidad de árboles con diferentes tamaños, hábitos de crecimiento y rendimiento, así como forma de fruta, tamaño, calidad, temporadas de maduración y otras características que le confieren rusticidad y adaptabilidad a ambientes distintos (Tong *et al.*, 1991; Martínez *et al.*, 2004, Pommer y Murakami, 2009).

En el país hay pocos cultivares y los principales son: “Criolla Roja”, el cual se utiliza también como porta injerto, “San Miguel” y “Rio Chiquito” (Aular y Casares, 2011), aunque de este último no existe ninguna descripción.

Cultivar “Criolla Roja”: se caracteriza por ser un árbol de copa piramidal, con un hábito de crecimiento semierecto, una altura desde el nivel del suelo de más de cinco metros y una distribución de ramas irregular. Las hojas son de forma elíptica y las flores solitarias y/o dispuestas en grupos. El fruto es una baya de forma esférica, cóncavo en sus extremos, con pulpa de color rojo, epidermis fina, casco delgado, de tamaño mediano y con un promedio de peso de 250 g (Laguado *et al.*, 1999; Molero *et al.*, 2003)

Cultivar “San Miguel”: es un híbrido que resultó del cruce de una planta del tipo “Criolla Roja” (introducción de Republica Dominicana) y una introducción de Filipinas, caracterizada esta última por presentar frutos de más de 1,2 kg de peso, pulpa de color blanco, epidermis muy delgada y mesocarpio grueso. El tipo “San Miguel” muestra características intermedias, tales como, árbol de copa irregular, con hábito de crecimiento extendido, de porte menor de tres metros, distribución de ramas horizontal, hojas lanceoladas y ligeramente curvadas. Las flores se disponen en las inflorescencias tanto solitarias como en grupo. El fruto es de forma ovoide, convexo, con cuello en su ápice y base deprimida o hundida, con pulpa de color rosado, epidermis gruesa, mesocarpio grueso, y un peso medio de 800 g (Laguado *et al.*, 1999).

Actualmente predomina el cultivar “Criolla Roja”, y no existen trabajos consistentes de selección de germoplasma sobresaliente y, menos aún, registros de variedades clonales mejoradas. Algunos cultivares han sido seleccionados a través de los años por

productores e investigadores por presentar algunas características promisorias, como la tolerancia al nematodo *Meloidogyne* sp. (Casassa *et al.*, 1997).

En el año 2007 en el marco del Convenio de Cooperación Cuba-Venezuela se introdujo desde la República de Cuba a Venezuela el cv. "Enana Roja Cubana EEA-1840", del cual se establecieron ensayos para su evaluación agronómica y propagación, (comunicación personal Ing. Agr. MSc. Evelyn Pérez, Coordinadora del CESID-FRUTICOLA Y APICOLA, CORPOZULIA). Sobre el cv. "Enana Roja Cubana EEA-1840", Vento (2011) reporta que fue seleccionado en el año 1962 en la Estación Experimental Agronómica de Santiago de las Vegas, La Habana, Cuba. Se originó a partir de una planta de semilla polinizada libremente por el cultivar "Indian Pink". El árbol es de porte pequeño, con frutos de diferentes formas y tamaños, pero generalmente en forma de pera, de pulpa roja-rosada. Es un cultivar de alto potencial productivo, reportándose para arboles de cinco años de edad, rendimientos de más de 70 Tm.ha⁻¹.año⁻¹ a densidades superiores a las 800 plantas.ha⁻¹. El follaje es de color verde oscuro. La introducción de este cultivar plantea la necesidad de desarrollar protocolos de propagación para la misma.

II.3. Limitaciones de la propagación convencional del cultivo del guayabo.

Las semillas de la guayaba son monoembríonicas y se mantienen viables por varios meses; a menudo, germinan en 2 o 3 semanas, pero, en ocasiones, este periodo se puede extender hasta 8 semanas. Además, se conoce que poseen hasta un 30% de polinización cruzada (Pommer y Murakami, 2009), confiriéndole heterogeneidad a las plantaciones en cuanto al vigor, forma y hábito de crecimiento de la

copa y características de la fruta (Aular y Echeverría, 2009). Este aspecto limita la propagación sexual como método de propagación masivo (Pontikis, 1996), por lo que en la actualidad este tipo de propagación es utilizada para la producción del material vegetal que se usa como patrón o porta-injertos en la propagación asexual mediante la técnica de injertación (Abbas *et al.*, 2013; Kareem *et al.*, 2013).

En la propagación asexual o vegetativa del guayabo, los métodos más empleados son el injerto, la estaca, y en menor cuantía, el acodo (Peña *et al.*, 1996; Albany *et al.*, 2004; Abbas *et al.*, 2013; Kareem *et al.* 2013). Sobre el primero, se utilizan diferentes tipos, entre los que se destacan de cuña lateral y enchape lateral (Ramírez *et al.*, 1999). En Venezuela la mayoría de las plantaciones provienen de plantas injertadas, siendo el cv. "Criolla Roja" el portainjerto más común (Aular y Casares, 2011). También se han probado portainjerto de especies afines como: *P. cattleianum sabine*, *P. molle* Bertol (Niedenzu) y *P. friedrichsthalianum* (Niedenzu). Este último se considera un genotipo promisorio para ser utilizado en campos infestados con *Meloidogyne incognita* raza 1 (Cassasa *et al.*, 1997; Vilchez *et al.*, 2004a), nematodo que causa la muerte regresiva en el guayabo.

En la propagación por estacas solo es necesario que se desarrolle un nuevo sistema de raíces adventicias, debido a que la estaca posee yemas con aptitud potencial para desarrollar nuevos vástagos (Khattak *et al.*, 2001; Kareem *et al.*, 2013). No obstante, la propagación del guayabo por estaquillado es afectada por la fenolización y la acción de microorganismos patógenos, lo cual trae consigo en algunos casos porcentajes de supervivencia bajos (Ramírez *et al.*, 1999). Además, se conoce que este método

promueve con el paso del tiempo un envejecimiento ontogenético de los propágulos y afecta su vigor (Rodríguez *et al.*, 2005).

En general, la propagación convencional presenta limitaciones relacionadas con el número de esquejes o vástagos que puede proveer un individuo elite o superior (Peña *et al.*, 1996), lo que la hace poco eficiente y difícil de masificar a niveles deseables (Ocampo y Nuñez, 2007). Por ello, se han llevado a cabo investigaciones para aplicar técnicas biotecnológicas con especial énfasis en la micropropagación, que permite la producción masiva de plantas de guayabos superiores o promisorios (Litz y Jaiswal, 1991; Akhtar *et al.*, 2000).

II.4. Generalidades de la micropropagación.

El término “micropropagación” fue empleado por primera vez en 1968 por Hartmann y Kester para designar varias de las técnicas utilizadas en la multiplicación *in vitro*. Se entiende por micropropagación, cualquier procedimiento aséptico que comprenda la manipulación en plantas, de órganos, tejidos o células que produzcan poblaciones de plántulas y que permitan el desvío tanto del proceso sexual normal como de la propagación vegetativa no aséptica que se practica convencionalmente. Es así una herramienta muy útil en los programas de mejoramiento, ya que tiene el potencial de producir plantas de calidad uniforme a escala comercial, a partir de un genotipo selecto y con una tasa de multiplicación ilimitada (Villalobos *et al.*, 1991; Olmos *et al.* 2004).

La micropropagación es posible gracias a la totipotencia celular o capacidad de las células vegetales de regenerar plantas enteras a partir de una o muy pocas células en cultivo *in vitro*, cuando están sujetas a estímulos adecuados (Olmos *et al.*, 2004; Peña, 2008).

Dos principales vías de regeneración han sido utilizadas para la propagación *in vitro*, la organogénesis, que se basa en la abolición de la dominancia apical y la proliferación de yemas axilares o adventicias y la embriogénesis somática que es la formación de embriones a partir de células somáticas (Vasil, 1994).

Según Pascual y Marín (2005), la organogénesis es la formación de una estructura unipolar que finalmente se diferencia en un nuevo órgano. Esta estructura puede ser un meristemo caulinar (caulogénesis) o un meristemo radicular (rizogénesis). Este proceso puede ocurrir a partir de estructuras preexistentes (yemas vegetativas) (Andreu y Marín, 2005), o de manera adventicia a partir de la formación de centros meristemáticos, los cuales son capaces de organizarse y conformar un ápice caulinar o radicular según el caso (Liu y Bao, 2003).

La embriogénesis somática es la vía del desarrollo celular mediante la cual las células somáticas dan lugar a estructuras semejantes a embriones cigóticos (organización bipolar sin conexión vascular al tejido parental) (von Arnold *et al.*, 2002).

La organogénesis es la más común de las vías de regeneración de plantas para la propagación *in vitro* y este método de propagación es lo que comúnmente es llamado micropropagación. Este método a pesar de no ser el más rápido, ha sido el más ampliamente utilizado para la propagación comercial. En la actualidad existe un mayor conocimiento de la biología de este proceso que de la embriogénesis somática y técnicamente es mucho más simple y no requiere de mano de obra altamente calificada (Orellana, 1998a).

Según Orellana (1998b), en la micropropagación comercial, pueden identificarse cinco etapas bien definidas con sus objetivos específicos:

Fase 0: Preparativa. En esta etapa se incluye la selección de la planta donadora y una serie de pretratamientos en condiciones higiénicas controladas, cuyo objetivo es mejorar la eficiencia en la implantación y el desarrollo posterior de los cultivos *in vitro*.

Fase I: Establecimiento o iniciación de los cultivos. El objetivo de esta fase es establecer cultivos axénicos y viables con los cuales iniciar el proceso de propagación.

Fase II: Multiplicación. Es considerada la etapa más importante del proceso donde se debe garantizar la propagación de los brotes y la estabilidad genética de las plantas producidas.

Fase III: Enraizamiento. Su objetivo es preparar las plántulas para su re-establecimiento en condiciones de suelo.

Fase IV: Aclimatación. Es la fase final del proceso y por tanto su meta es lograr plantas listas para su trasplante definitivo a campos comerciales de producción o invernaderos.

La embriogénesis somática es un método ampliamente considerado como el más eficiente para la producción masiva de plantas *in vitro* (Guerra *et al.*, 1997), debido a la naturaleza bipolar del embrión y la facilidad con que puede ser automatizado todo el proceso productivo, los altos coeficientes de multiplicación en cortos períodos de tiempo al poder aplicarse los principios de la cinética microbiana y la posibilidad de encapsular estas estructuras y obtener semillas artificiales (Gómez, 1998; Rai *et al.*, 2008).

II.5. Generalidades sobre la embriogénesis somática.

Haccius en 1978 describió un embrión vegetal (cigótico o no), como un nuevo individuo que surge de una célula individual y que no tiene conexiones vasculares con el tejido materno. La embriogénesis somática se define como un proceso en el que una estructura bipolar, semejante a un embrión cigótico, se desarrolla a partir de una célula no-cigótica (célula somática), sin conexión vascular con el tejido original. En la embriogénesis somática, las células somáticas se desarrollan en plantas diferenciadas a través de estados embriogénicos característicos sin la fusión de gametos (Williams y Maheswaran, 1986, von Arnold *et al.*, 2002; Jiménez, 2005). La diferencia principal con la embriogénesis cigótica es que las células que dan origen al embrión somático no resultan de la fecundación sexual por lo que tienen la misma combinación genética de la planta fuente del explante (Parrot, 1993). La embriogénesis somática no es un fenómeno artificial y es conocido en la naturaleza como una forma de apomixis llamada embrionía adventicia. Es un fenómeno biológico basado en totipotencialidad de las células vegetales, descrito por Haberlandt en 1902.

La embriogénesis somática *in vitro* es posible ya que virtualmente cualquier tejido somático vegetal tiene la capacidad de desarrollarse en un embrión (totipotencia) a través de la manipulación de las condiciones de cultivo y la aplicación de reguladores del crecimiento. La primera demostración de que las plantas podían producir embriones somáticos *in vitro* fue publicada en 1958 (Reinert, 1958 y Steward *et al.*, 1958). Este es un hecho bien establecido en más de 200 especies de importancia agronómica. Los embriones somáticos se pueden obtener de células vegetativas, tejidos reproductivos, embriones cigóticos o de callos producidos de cualquiera de las partes de la planta (Copeland y McDonald, 1995). La embriogénesis

somática ha surgido como una nueva vía de propagación y constituye una herramienta de trabajo para la conservación *in vitro* de germoplasma (Griga, 2000) y el mejoramiento genético (Das *et al.*, 2002). Esta técnica permite incrementar los coeficientes de multiplicación, disminuir los costos de producción y da la posibilidad de automatizar el proceso productivo con el uso de biorreactores (Curtis, 2005).

De acuerdo a Sannasgala (1989) y Escalant *et al.* (1994), el embrión somático presenta las siguientes características:

- Tiene autonomía frente al tejido generador (protegido generalmente por una epidermis) y se plantea que histológicamente no tiene conexión con el tejido que le dio origen.
- Es una estructura bipolar con un ápice radical, apical y cotiledones.
- Presenta bandas procambiales entre los ápices.

II.5.1. Etapas de la embriogénesis somática.

II.5.1.1. Inducción de la embriogénesis somática.

La inducción de la embriogénesis somática está determinada por cambios en la expresión génica, en aquellas células del explante, que dan lugar a embriones somáticos (Evans *et al.*, 1981; Sharp *et al.*, 1983; Karami y Saidi, 2010).

En general, el proceso de inducción está mediado por auxina y se caracteriza por la formación de masas de células pro-embriogénicas a partir de células competentes presentes en el explante. En las masas de células pro-embriogénicas, la división celular tiene lugar en las

regiones más superficiales, mientras que células centrales altamente vacuolizadas entran en senescencia. En presencia de auxina, grupos de células meristemáticas con citoplasma muy denso se desprenden de la capa superficial de las masas pro-embriogénicas y continúan proliferando activamente.

El origen unicelular o multicelular de los embriones somáticos es un punto controversial. Se ha ilustrado el desarrollo directo de embriones a partir de una sola célula (Steward, *et al.*, 1958) pero también se han reportado muchos casos en que los embriones se forman a partir de agregados de células meristemáticas. Haccius (1978), sugiere que aunque un embrión somático provenga de un grupo de células en división, este complejo de células se forma a partir de una sola célula que se divide. Sin embargo lo anteriormente expuesto también sugiere un origen unicelular del embrión.

Canhoto y Cruz (1996), señalan que en *Feijoa sellowiana* Berg (Myrtaceae), la embriogénesis somática sigue dos patrones de diferenciación, a partir de una simple célula epidermal y de grupos de células meristemáticas de la superficie adaxial de cotiledones

Litz *et al.*, (1998), señalan que la obtención de cultivos embriogénicos de árboles frutales tropicales y subtropicales depende básicamente de tres factores: el genotipo (especie-cultivar), el tipo de explante (y su fase de desarrollo), y el medio de la inducción.

En relación al genotipo se ha visto que en aquellas especies que en la naturaleza muestran el fenómeno de embriogénesis, como *Citrus sinensis* y *Mangifera indica*, tienen buena capacidad embriogénica *in vitro* (Pliego y Barceló, 2001).

Se ha observado que genotipos provenientes de una misma especie, pueden diferir en cuanto a su capacidad para formar embriones somáticos, lo cual está dado por las diferentes habilidades para activar las rutas embriogénicas (Parrot, 1993). Esto es especialmente evidente en cultivos de árboles tropicales donde se manifiesta un fuerte efecto del genotipo en el patrón de mantenimiento de los cultivos embriogénicos.

Los tratamientos para la obtención de embriogénesis somática dependen de si el tejido del explante está formado o constituido por células somáticas determinadas preembriogénicamente (CsDPE) o de células somáticas no embriogénicas. Las CsDPE, son aquellas células que pueden expresar los genes de la embriogénesis (Gómez, 1998) y también dan lugar a una embriogénesis directa. En caso contrario, la inducción de embriogénesis requiere de una fase previa de callo (embriogénesis indirecta).

En muchos sistemas experimentales, desarrollados para especies recalcitrantes, el establecimiento de un protocolo eficiente de embriogénesis somática se basa en el uso de material juvenil como fuente de explante (Carman, 1990; Karunaratne *et al.*, 1991). Merkle (1995), señala que la poca capacidad del tejido maduro para iniciar cultivos embriogénicos, es la mayor limitación de la embriogénesis somática en especies leñosas. Para lograr el éxito en la embriogénesis somática, el explante debe ser obtenido de plantas altamente vigorosas. Además, órganos o tejidos inmaduros son más morfogénicamente plásticos *in vitro*, que órganos o tejidos maduros (Tisserat, 1991).

Se ha señalado que en especies recalcitrantes, se suelen utilizar como explantes embriones inmaduros, ya que al estar formados por células poco diferenciadas tiene alto potencial morfogenético; sin embargo,

dado que los individuos que se obtienen a partir estos explantes no tienen valor agronómico probado, es conveniente utilizar como material de partida células somáticas de plantas maduras como por ejemplo, tejido de nucela, inflorescencias o secciones de hojas jóvenes. (Pliego y Barceló, 2001).

En general, las especies de la familia Myrtaceae donde se ha logrado la embriogénesis somática tienen como punto de partida explantes provenientes de material juvenil como: embriones cigóticos inmaduros o sus secciones, hojas cotiledonares, nucelas y plántulas (Litz, 1984a; Litz, 1984b; Cruz *et al.*, 1990; Termignoni *et al.*, 1996; Canhoto y Cruz, 1996; Parra y Amo-Marco, 1998; Canhoto *et al.*, 1999).

En el guayabo el primer informe sobre la embriogénesis somática apareció a principios de la década de los 90 y a partir de ahí ha habido otros trabajos sobre el tema (Akhtar y Jaiswal, 1994; Akhtar (1997, 2010, 2012, 2013a, 2013b; Chandra *et al.*, 2004 y 2007; Vilchez *et al.* 2002 y Rai *et al.*, 2007).

En Myrtaceae los embriones cigóticos son los explantes de mejores resultados y el estado fisiológico de éstos resulta un factor determinante y contradictorio en ocasiones (Kim *et al.*, 1999; Mauri y Manzanera, 2003). En *Myrtus communis* L., por ejemplo, mientras algunos autores plantean que los embriones cigóticos inmaduros (torpedo) producen los mejores resultados (Parra y Amo-Marco, 1999), otros aseguran que la embriogenesis ocurre solo cuando se utilizan embriones cigóticos cotiledonares maduros (Canhoto *et al.*, 1999). En el guayabo, que es una especie que tiene alrededor de un 35 % de polinización cruzada (Yadava 1996, Papadatou, 1996), se ha logrado inducir la embriogénesis somática utilizando como explante embriones cigóticos inmaduros en estado torpedo (Vilchez *et al.*

2002) y a partir de tejido de mesocarpo de frutos inmaduros (Chandra *et al.*, 2004).

Los sistemas de embriogénesis somática son una herramienta importante para el mejoramiento y la propagación clonal masiva de genotipos seleccionados y el uso de embriones cigóticos como explante puede justificarse cuando los métodos de propagación convencional presentan una baja eficiencia (Guerra *et al.*, 1996; Etienne *et al.*, 1997a). Además estas plantas provenientes de embriones cigóticos constituyen un material genéticamente uniforme, que debe ser estudiado como líneas genéticas y cuyas características genéticas y agronómicas podrían evaluarse en un tiempo relativamente corto (Papadatou *et al.*, 1990).

Para la inducción de embriogénesis somática generalmente se ha usado el medio de cultivo MS propuesto por Murashige y Skoog (1962) con algunas modificaciones del mismo, como la reducción de sus sales a la mitad de su concentración (Litz, 1984a; Litz, 1984b, Parra y Amo-Marco, 1998). En la mayoría de los reportes de embriogénesis somática en mirtáceas, el medio MS es la formulación más utilizada (Litz, 1984a; 1984b; Canhoto y Cruz, 1996; Parra y Amo-Marco, 1999). Sin embargo, otros casos exitosos como el de la *Feijoa sellowiana*, han logrado los mejores resultados con modificaciones del medio basal LPm (Guerra *et al.*, 1997; Dal Vesco y Guerra, 2001). En el guayabo, en la mayoría de los casos exitosos se utilizó el uso de medio MS o modificaciones del mismo (Chandra *et al.* 2004; Rai *et al.* 2007). Aunque, Biswas *et al.* (2005) no obtuvieron embriones somáticos en los medios de cultivo MS, B5 o N6; por lo que utilizaron su propio medio de cultivo.

La exigencia de auxinas u otros reguladores de crecimiento para el inicio de embriogénesis somática se determina en gran medida por la

etapa de desarrollo del tejido de explante. La inducción de embriogénesis en el explante primario se limita a la respuesta de ciertas células que tienen el potencial para activar los genes implicados en la generación de células embriogénicas (Rai *et al.* 2010), siendo necesario para la expresión de estos genes, la presencia de una auxina fuerte en el medio de cultivo. Según Karami y Saidi *et al.* (2010), la inducción de la embriogénesis está relacionada con la metilación de ADN, lo cual causa una disminución o cese de la expresión del programa genético de la célula, permitiendo la expresión de los genes que regulan la embriogénesis somática.

De una lista de 65 especies dicotiledóneas revisadas por Jiménez (2005), la embriogénesis somática fue inducida en 17 especies en medio de cultivo libre de hormonas, en 29 especies el medio de cultivo contenía auxinas y en 25 especies el medio fue suplementado con una citoquinina. De las auxinas empleadas, la más frecuentemente empleada en la embriogénesis somática fue el 2,4-D (49%), seguido por el ácido naftalenacético (27%), ácido indol-3-acético (6%), ácido indol-3-butírico (6%), Picloram (5%) y Dicamba (5%). LoSchiavo *et al.* (1989), señalan que existe una correlación positiva entre la cantidad de ADN metilado y la cantidad de auxina exógena. En el caso de citoquininas, la N⁶-bencilaminopurina fue la más usada (57%), seguida por la kinetina (37%), zeatina (Z) (3%) y el tidiazuron (3%).

En la mayoría de los reportes de embriogénesis somática en Myrtaceae, se ha utilizado el 2,4-D, como regulador de crecimiento para inducir la embriogénesis somática, en concentraciones que están entre 1 y 2 mg.L⁻¹ (Litz, 1984a; Litz, 1984b; Cruz *et al.*, 1990; Parra y Amo-Marco, 1998; Canhoto *et al.*, 1999; Vilchez *et al.*, 2002; Akhtar (1997, 2010, 2013b).

En algunas especies se ha encontrado influencia de la concentración de sacarosa sobre la formación de callo con estructuras embriogénicas y de embriones somáticos, ya que altas concentraciones de sacarosa ($>40 \text{ g.L}^{-1}$) actúan como factor estresante que induce el proceso de la embriogénesis somática en algunas especies (Litz, 1984a; Litz, 1984b Kamada *et al.*, 1989; Witjaksono y Litz, 1999). Sin embargo, Canhoto *et al.* (1999) encontraron mayores porcentajes de inducción con concentraciones menores de sacarosa (30 g.L^{-1}) en *Myrtus communis* L.

II.5.1.2. Embriogénesis somática secundaria o repetitiva.

La proliferación de centros embriogénicos tiene lugar en presencia de auxina; al eliminar la auxina, los centros embriogénicos dan lugar a embriones globulares que posteriormente pasaran a estado torpedo y cotiledonar. Estos embriones pueden proliferar mediante embriogénesis secundaria o repetitiva. Este proceso consiste en la formación *di novo* de embriones a partir de embriones somáticos previamente inducidos (Gómez, 1998).

Los embriones somáticos se multiplican por embriogénesis secundaria, lo que genera un proceso recurrente. En general, la capacidad de multiplicación clonal mediante embriogénesis recurrente es muy elevada, aparentemente ilimitada en el tiempo y libre de condicionantes estacionales, lo que proporciona un inmenso potencial multiplicativo a esta técnica (Celestino *et al.* 2005).

Este fenómeno ha sido descrito en al menos 80 especies de Gynospermas y Angiospermas (Merkle, 1995). La embriogénesis somática secundaria comparada con la embriogénesis primaria, presenta mayores ventajas tales como: alto coeficiente de multiplicación, independientemente de la fuente de explante y

repetitividad; además la embriogénesis somática puede ser mantenida por periodos de tiempo prolongados mediante ciclos repetitivos de embriogénesis secundaria (Raemaker *et al.*, 1995), lo cual pudiera ser una alternativa para la rápida propagación de materiales promisorios (Vilchez *et al.* 2004b).

La proliferación de las células embriogénicas puede tomar varios caminos que están aparentemente influenciados por una variedad de factores como: especie, regulador de crecimiento, fuente de nitrógeno, etc.; algunos de los cuales pudieran ser controlados durante el proceso de cultivo y algunos aún no están definidos (Merkle, 1995).

La embriogénesis somática secundaria constituye uno de los aspectos más interesantes de la embriogénesis somática, debido a las posibles aplicaciones de la misma. En cultivos con un ciclo de vida largo, como las especies leñosas, es posible mantener líneas embriogénicas preservadas *in vitro* mientras son probadas bajo condiciones de campo. Una vez seleccionadas las líneas pueden ser multiplicadas en grandes cantidades por embriogénesis secundaria. Además, la embriogénesis secundaria puede ser usada para la producción de embriones somáticos de especies en las cuales los embriones cigóticos contienen metabolitos de importancia económica (Raemaker *et al.*, 1995; Sánchez *et al.*, 2002). El principal cuello de botella se encuentra en la producción sincrónica de embriones de calidad, que den lugar a plantas vigorosas (Celestino *et al.* 2005).

II.5.1.3. Germinación y conversión en plantas de los embriones somáticos.

Dentro del proceso de la embriogénesis somática los pasos finales los constituyen la germinación y la conversión en plantas. Las primeras

señales de la germinación de los embriones somáticos son la elongación del hipocótilo, desarrollo del color verde de los cotiledones y la elongación de la radícula (Alemano *et al.*, 1997; Canhoto *et al.*, 1999). La conversión es definida por unos autores como el desarrollo del brote con emisión del primer par de hojas verdaderas (Alemano *et al.*, 1997); mientras que otros la definen como la supervivencia del propágulo en condiciones ambientales *ex vitro* (Stuart y Strickland, 1984).

Aunque en la mayoría de los reportes de embriogénesis somática de especies leñosas no se da mucha información sobre estos procesos, se sabe que las bajas tasas de regeneración de plantas son causadas por problemas en la germinación y conversión de los embriones somáticos (Kiss *et al.*, 1992).

Muchos reportes señalan la necesidad de dar varios subcultivos en el medio de germinación, para lograr que germinen los embriones somáticos; como consecuencia de la asincronía en cuanto a las etapas de desarrollo de los embriones somáticos (Litz, 1984a; Litz, 1984b; Cruz *et al.*, 1990). Al respecto, Gómez (1998), señala que un tratamiento de secado parcial o total del embrión somático aumenta su posterior germinación y crecimiento, normalizando y sincronizando la germinación; además de facilitar el crecimiento simultáneo de las raíces y el brote.

Se ha reportado que los embriones somáticos de especies Myrtaceae germinan bien en medios simples, por lo general a la mitad de las sales y sin hormonas (Litz, 1984a; Litz, 1984b; Parra y Amo-Marco, 1998) y la sincronización en la germinación es mejorada cuando se da un subcultivo a los embriones somáticos en un medio con un contenido de sacarosa de 20 g.L⁻¹ (Canhoto *et al.*, 1999). El ácido giberélico solo o combinaciones de éste con BA, al igual que el agua

de coco, mejoraron la germinación de los embriones somáticos en *Myrciaria cauliflora* (Litz, 1984a), *Eugenia* sp. (Litz, 1984b) y *Myrtus communis* (Canhoto *et al.*, 1999). Vilchez *et al.* (2005), señalaron una mayor y eficiente germinación de embriones somáticos de *Psidium guajava* empleando sistemas de inmersión temporal, con los cuales se logra una mayor sincronización de la germinación.

Ruiz *et al.* (2004) ha indicado que, en algunas Myrtaceae como *Eucalyptus grandis* y *Eucalyptus urophylla*, la obtención de plantas completas regeneradas vía embriogénesis somática en la fase de aclimatación ha sido un factor crítico aún cuando se tenga la reproducción de gran número de embriones somáticos, pues se han encontrado bajos porcentajes de conversión haciendo muy difícil la recuperación de plantas. Estos autores señalan que las características y la habilidad de la conversión de embriones a plantas, incluye la participación de diversos factores como sistemas de cultivo, genotipos, balances de reguladores de crecimiento y sobre todo influencia del control genético, ya que investigaciones recientes demuestran que en el desarrollo de embriones somáticos y su germinación, existe un control con base genética que evidencia la formación de embriones.

Para mejorar las tasas de conversión, puede ser importante tener en cuenta el momento de la transferencia *ex vitro*, dado que en algunas especies se ha observado que la transferencia de los embriones recién germinados proporciona mejores tasas que la de plantas inicialmente desarrolladas *in vitro* (Merkle y Watson-Pauley, 1994). Para el acondicionamiento de las plantas en condiciones *in vitro*, se ha estudiado el efecto de algunos reguladores como giberelinas y brasinoesteroides (Gómez *et al.*, 1996), así como de sustancias complejas (hidrolizado de caseína y leche de coco) (Rugkhla y Jones, 1998).

II.6. Aumento de eficiencia de las fases de maduración y germinación: empleo de sistemas de inmersión temporal.

En especies leñosas las bajas tasas de germinación de embriones somáticos y de conversión en plantas es una limitación grave (Lee *et al.*, 2001). Estas limitaciones son causadas por una pobre calidad de los embriones somáticos, que está determinada por su estado de maduración y capacidad de germinación (Afreen *et al.*, 2002), que a su vez depende de la acumulación de sustancias de reserva y la tolerancia a la desecación (Etienne *et al.*, 1993; Lee *et al.*, 1997; Deo *et al.*, 2011). La acumulación de sustancias de reserva y grado de desecación (bajos niveles de potencial hídrico) en el embrión somático dependen de factores como: el medio de cultivo, balance hormonal, estrés fisiológico y atmosfera de cultivo (Fernández *et al.*, 1995; Afreen *et al.*, 2002; Deo *et al.*, 2011; Smertenko *et al.*, 2014). La atmosfera de cultivo es uno de los factores que en los últimos años se ha investigado, ya que gases como el CO₂ y el etileno juegan un papel importante en la morfogénesis de los embriones somáticos (Jiménez, 2005).

Las principales características del ambiente gaseoso en los sistemas de micropropagación convencional, son una humedad relativa alta, grandes fluctuaciones diurnas en la concentración de CO₂, así como acumulación de etileno y otras sustancias tóxicas (Kozai y Kubota, 1992). Se sabe que el etileno se acumula en recipientes de cultivo con bajo intercambio de aire y se asocia con diversas respuestas fisiológicas de las plantas cultivadas *in vitro* durante su crecimiento y desarrollo, como la pobre diferenciación celular y la ausencia de embriogénesis somática (Meijer y Brown, 1988; Roustan *et al.*, 1989). La humedad relativa es normalmente alta en el recipiente de cultivo y puede tener algunos efectos deletéreos sobre las plántulas cultivadas. Varios estudios han demostrado que la reducción de la

humedad relativa en el recipiente de cultivo mejoró la resistencia de los tejidos a la pérdida de agua (Wardle *et al.*, 1983; Smith *et al.*, 1992), así como la germinación de embriones somáticos y su conversión en plantas (Afreen *et al.*, 2002).

Los recipientes de cultivo con ventilación forzada promueven una mejor distribución del CO₂ y la reducción de la humedad relativa en el recipiente de cultivo, debido a la descarga continua de aire desde el recipiente (Zhao *et al.*, 2012), y con ello mejoran la maduración y germinación de embriones somáticos. Dentro de los recipientes con ventilación forzada los sistemas de inmersión temporal han demostrado mejorar la germinación de embriones somáticos en varias especies (Mallón *et al.*, 2012, Barbón *et al.*, 2014), lo cual se explica por el hecho que estos sistemas combinan la ventilación del recipiente de cultivo con el contacto intermitente entre el medio de cultivo y los explantes (Etienne *et al.* 1997b; Georgiev *et al.*, 2014). La ventilación del recipiente de cultivo impide la acumulación excesiva de CO₂, y etileno (Martre *et al.* 2001; Roels *et al.*, 2006), y el contacto intermitente entre la mayor parte o la superficie completa de los propágulos con el medio de cultivo, mejoran la difusión de nutrientes entre estos y el medio de cultivo (Martre *et al.* 2001; Watt, 2012).

Los sistemas de inmersión temporal, también permiten el control del ambiente gaseoso del recipiente de cultivo, además, se prolonga el tiempo de subcultivo y se facilitan los cambios de medio y la automatización (Berthouly y Etienne, 2005; Quiala *et al.*, 2012; Watt, 2012). Además, en los sistemas de inmersión temporal con cada emersión (periodo entre cada inmersión) es posible controlar la humedad relativa del recipiente de cultivo permitiendo la desecación de los embriones somáticos y con ello su maduración (Etienne *et al.* 1997); también se reduce el número de embriones anormales

(Tahardi *et al.* 2003) y se mejora la sincronización del crecimiento de los embriones somáticos (Cabasson *et al.*, 1997; Tahardi *et al.* 2003).

Berthouly y Etienne (2005), señalan que para desarrollar un sistema de micropropagación eficiente en sistemas de inmersión temporal es esencial optimizar los parámetros técnicos para cada cultivo; siendo el tiempo y la frecuencia de inmersión los parámetros más críticos del sistema. El tiempo de inmersión va a determinar la absorción de nutrientes, la expresión de hiperhidricidad en los propágulos (Albarrán *et al.*, 2005; Berthouly y Etienne, 2005), así como la frecuencia de inmersión. Se han reportado diferentes tiempos y frecuencias de inmersión en la germinación de embriones somáticos en especies leñosas como *Citrus* spp, 1 min cada 4 h (Cabasson *et al.*, 1997), cacao, 1 min cada 8 h (Niemenak *et al.*, 2008), guayaba, 1 min cada 12 h (Vilchez *et al.*, 2001), *Bactris gasipaes*, 3 min cada 6 h (Steinmacher *et al.*, 2011) y café, 1 min cada 12 h (Barbón *et al.*, 2014). Otro parámetro a considerar en los sistemas de inmersión temporal es la densidad de inoculación; así, Shigeta *et al.* (1996) y De Fera *et al.* (2005) han señalado la densidad de inoculación como un factor importante para incrementar la producción de embriones somáticos y garantizar elevados porcentajes de germinación, ya que en algunas especies cuando se utilizan elevadas densidades se ha limitado el proceso de diferenciación, pero en otras se favorece la formación y multiplicación de un gran número de embriones somáticos (Barbón *et al.*, 2014).

II.7. Crecimiento en vivero de las vitroplantas. Fase de aclimatación.

Los objetivos primarios de la fase de aclimatación son: lograr la supervivencia de las vitroplantas (plantas regeneradas *in vitro*) al momento del trasplante y su crecimiento hasta alcanzar un desarrollo

que les permita ser trasplantadas a campo abierto, lo cual normalmente sucede en fase de vivero. Durante este periodo ocurren muchas pérdidas de plantas (Kozai, 1991; Agramonte *et al.*, 1998) debido a que en el proceso normal de micropropagación, los brotes, embriones germinados y vitroplantas son cultivados en medios de cultivo con azúcares, vitaminas y otras sustancias orgánicas, lo que determina el desarrollo heterótrofo o mixótrofo (nula o baja capacidad fotosintética) de los mismos (Afreen, 2005). Sin embargo, durante la fase de aclimatación estos propágulos son forzados a ser completamente autótrofos y a sintetizar los compuestos orgánicos necesarios a partir de minerales, agua, CO₂ y luz (Agramonte *et al.*, 1998; Kozai, 2005). Adicionalmente, el ambiente *in vitro* (alta humedad relativa, baja intensidad luminosa, temperatura constante, bajo o nulo intercambio gaseoso en el frasco), condiciona cambios en la morfología de las vitroplantas que influyen en la capacidad de supervivencia y crecimiento (Afreen, 2005). Por estas razones, es necesario obtener vitroplantas de calidad, bajo condiciones *in vitro* para asegurar un alto porcentaje de sobrevivencia bajo condiciones de vivero (Díaz *et al.*, 2010).

En la aclimatación se produce un retorno gradual de las plantas a sus características morfológicas normales, después de las etapas *in vitro*. La eficiencia en la aclimatación es trascendental para la propagación comercial, pues del resultado de ésta dependerá en gran medida la eficiencia total del proceso y la calidad final de las vitroplantas (Agramonte *et al.*, 1998).

Uno de los aspectos menos estudiados en el crecimiento de los cultivos frutícolas, es la fase de vivero y el cultivo del guayabo no es la excepción. En fase de vivero se optimizan las condiciones para lograr un rápido desarrollo de la plántula, con el fin de promover su crecimiento y llevarla a campo lo más pronto posible. En el cultivo del

guayabo no existe información que vaya más allá de describir muy someramente las prácticas agronómicas a aplicar en esta fase.

Al crecimiento se le puede definir como el aumento de protoplasma o el incremento en peso seco o volumen irreversible que ocurre en un órgano o en la planta completa (Montaldi, 1995), acompañado de procesos como la morfogénesis y la diferenciación celular (Segura, 2008). El patrón de crecimiento de una generación se describe por medio de la curva sigmoide, que resulta de las tasas de crecimiento diferenciales durante su ciclo de vida (Hunt, 1990).

El análisis de crecimiento es una técnica fundamental utilizada para cuantificar los componentes de crecimiento, representa el primer paso en el análisis de la producción primaria y es el método más práctico para la evaluación de la producción neta de fotosíntesis (Nogueira *et al.*, 1994). Es una aproximación cuantitativa para entender el crecimiento de una planta o de una población de plantas bajo condiciones ambientales naturales o controladas. Es una técnica que utiliza modelos matemáticos para cuantificar la relación existente entre el crecimiento de una planta, la producción de materia seca y la expansión de área foliar, entre estos factores y una condición ambiental como la luz, el agua o los nutrientes (Clavijo, 1989).

El análisis matemático de crecimiento usa medidas directas tales como masa seca total de la planta, área foliar total y tiempo, así como, medidas derivadas como son la tasa de crecimiento relativo (TCR), tasa de crecimiento del cultivo (TCC), tasa de asimilación neta (TAN), duración del área foliar (DAF), relación del área foliar (RAF), y el índice del área foliar (IAF) que pueden ser obtenidas a partir de las medidas directas (Barrera *et al.*, 2010). Estas son de gran utilidad para conocer como un ambiente o práctica de manejo afecta la eficiencia fotosintética de una planta con respecto a otra, o bien

detectar diferencias entre variedades cultivadas bajo las mismas condiciones ambientales (Palomo, 2003).

Las distintas especies vegetales difieren notablemente en su capacidad de crecimiento cuando se cultivan en condiciones parecidas. En general, una variable muy simple, a nivel foliar, como es el área específica foliar (la relación entre área y peso foliar) está estrecha y positivamente asociada con TCR (explicando hasta un 80% de la variación de TCR). También otros factores como la fisiología (ejemplo la TAN) puede explicar, aunque en menor grado, las diferencias en TCR entre especies. La distribución de biomasa a las hojas también se encuentra generalmente relacionada positivamente con TCR, mientras que la distribución a raíces lo está negativamente (Villar *et al.*, 2004).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

La fase de laboratorio de esta investigación se realizó en las instalaciones del laboratorio de Biotecnología "Profa. Silvia León de Sierralta" y la de adaptación de las vitroplantas a condiciones *ex vitro* en el invernadero de la cátedra Fisiología Vegetal. El procesamiento para los estudios histológicos se realizó en el Herbario de la Universidad del Zulia (HERZU). Todas las instalaciones mencionadas están ubicadas en la Facultad de Agronomía de la Universidad del Zulia en Maracaibo, Venezuela.

III.1. Material vegetal.

Siguiendo la metodología descrita por Vilchez *et al.* (2002), el material vegetal utilizado para inducir la embriogénesis somática, lo constituyó embriones cigóticos provenientes de frutos inmaduros de guayabo, cv. "Enana Roja Cubana EEA-1840", cosechados entre 25 y 35 días después de la antesis, de color verde intenso y consistencia dura, cuyo tamaño varió de 3,6-4,0 cm de diámetro polar y 3,2-3,5 cm de diámetro ecuatorial. Las plantas de las cuales se extrajeron los frutos están sembradas en el estado Zulia, en un huerto experimental, en el Centro Socialista de Investigación y Desarrollo Frutícola y Apícola (+10° 50' 27,42", -71° 46' 40,57") perteneciente a la Corporación para el Desarrollo de la Región Zuliana (CORPOZULIA). Una vez cosechados los frutos se transportaron bajo condiciones refrigeradas a una temperatura de 10 °C al laboratorio, donde se lavaron con agua y jabón líquido. Posteriormente se les eliminó la corteza y se desinfectaron con una solución de NaClO al 3 % (v/v) durante 10 min, posteriormente fueron enjuagados tres veces con agua destilada estéril y divididos longitudinalmente en cuatro secciones. De cada una de las secciones se separó la masa de semillas del endocarpo y bajo condiciones asépticas y empleando una

lupa estereoscópica (MOTIC, modelo SMZ 168 TL, HK, Japón) los embriones cigóticos inmaduros fueron separados del saco embrionario (figura 1 a y b) y seguidamente cultivados en medio de inducción de embriogénesis somática.

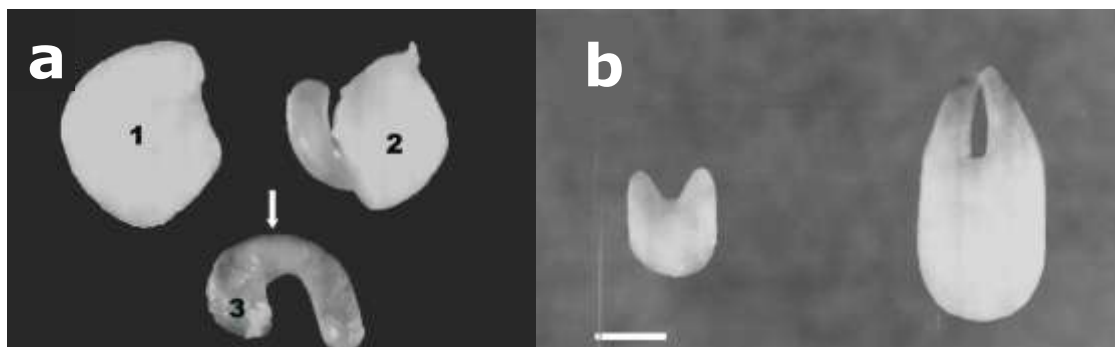


Figura 1. Preparación del explante para la inducción de embriogénesis somática en guayabo cv. "Enana Roja Cubana EEA-1840". a) Embrión cigótico inmaduro: (1) semilla de 25-35 días después de la antesis, (2) vista de la semilla y el saco embrionario y (3) saco embrionario, la flecha indica la ubicación de un embrión cigótico dentro del saco embrionario. b) Embriones cigóticos en etapa corazón y torpedo. Barra de escala = 0,2 mm.

III.2. Procedimientos generales.

Se utilizaron como recipientes de cultivo viales de vidrio de 24 mL de capacidad, frascos biotecnológicos de vidrio de 250 mL de capacidad y placas de Petri de 15 cm de diámetro. En todos los experimentos el pH de los medios de cultivo fue ajustado a 5,8 con NaOH 1N y HCl 1N antes de su esterilización en autoclave a 121°C y 1,2 Kg.cm⁻² durante 20 min.

Todas las manipulaciones de los explantos se realizaron bajo condiciones de asepsia empleando una cámara de flujo laminar horizontal (ESCO® modelo EQU/06-EHC, PA, EEUU) provista de un filtro HEPA 0,3 µm y flujo constante de aire de 0,5 PSI. El instrumental (pinzas y bisturí) fue desinfectado con una solución de NaClO al 1% (v/v) durante 15 minutos y las placas de Petri fueron

esterilizadas en autoclave a 121°C y 1,2 Kg.cm⁻² de presión, durante 60 min y posteriormente se secaron en estufa a 70°C durante 8 h.

III.3. Estudios histológicos del proceso de embriogénesis somática en guayabo.

Para el procesamiento histológico se siguió un procedimiento igual para todas las muestras. Las muestras se fijaron durante 24-48 h en una solución de formalina-ácido acético-alcohol etílico (FAA) al 5-5-90% (v/v), respectivamente. Luego se realizó un lavado con agua corriente durante 24 h para eliminar el exceso de fijador. Una vez concluido el lavado, el tejido fue deshidratado en concentraciones seriadas de alcohol etílico (50, 75, 85 y 95% (v/v)) sucesivamente durante periodos de 1,5-2 h. Seguidamente, las muestras se sumergieron tres veces en alcohol etílico puro, durante 2 h cada vez. Después del proceso de deshidratación las muestras fueron aclaradas con xilol y se embebieron en una serie de tres periodos en parafina (57-58 °C) con un período de impregnación de 1,5 h por periodo. Seguidamente fueron incluidas en bloques de parafina a los que se les realizaron cortes seriados con un espesor de 5-8 µm, utilizando un micrótopo manual de deslizamiento vertical. Los cortes seriados se tiñeron con safranina y fueron fijados en portaobjetos para su posterior observación en un microscopio plano Leica con cámara digital. La fotodocumentación se realizó con objetivos de 4X, 10X, 40X y 100X, con el Software de Análisis de Imagen Image Pro Plus.

III.4. Técnicas de procesamiento y análisis de datos.

En el procesamiento de los datos de los experimentos se aplicó la prueba de Shapiro-Wilk (Shapiro y Wilk, 1965) para comprobar los supuestos de una distribución normal. Cuando los datos de las variables respuestas no se ajustaron a dicha distribución, sus valores

fueron transformados estadísticamente, a fin de ajustarlos a la misma. Las transformaciones aplicadas a los datos se indican en los cuadros de resultados.

Para determinar la significación ($P \leq 0,05$) de los efectos de los factores de estudio se utilizó el análisis de la varianza (ANADEVA) y en aquellos casos donde el efecto del factor de estudio y/o su interacción resultó significativa estadísticamente se realizaron comparación de medias, mediante las pruebas de Tukey o mínima diferencia significativa (LSD).

En todos los casos en el procesamiento de los datos se utilizó el software analítico Statistix[®] versión 8.0 (Analytical Software, Tallahassee, Florida, EEUU) y cuando se calcularon curvas de estimación, se realizó mediante el software de doble precisión Curve Expert versión 1.4 (Hyams, 2005).

III.5. Inducción de embriogénesis somática en guayabo.

Experimento 1. *Efecto de la auxina en la inducción de embriogénesis somática en guayabo a partir de embriones cigóticos inmaduros.*

Para evaluar el efecto de la auxina en la inducción de embriogénesis somática en embriones cigóticos inmaduros de guayabo, se realizó un experimento factorial evaluando las auxinas, ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y ácido 3,6-dicloro-2-metoxibenzoico (Dicamba) a tres concentraciones cada una (1, 2 y 4 mg.L⁻¹). El medio de cultivo utilizado fue el propuesto por Vilchez *et al.* (2002) el cual consistió en el medio MS (Murashige y Skoog, 1962) modificado de la siguiente manera: la mitad de los macroelementos, 400 mg.L⁻¹ de L-glutamina, 100 mg.L⁻¹ de ácido ascórbico, 60 g.L⁻¹ de sacarosa y

gelificado con $2,4 \text{ g.L}^{-1}$ de Phytigel[®] (Sigma-Aldrich[®]). Se empleó como explanto embriones cigóticos inmaduros de guayabo en etapa de torpedo-elongado o cotiledonar (figura 1 b), los cuales se sembraron en viales de vidrio con 10 mL de medio de cultivo según los tratamientos evaluados. El número de repeticiones fue de ocho por cada tratamiento. Cada repetición estuvo constituida por cinco viales con un embrión cigótico en cada vial. Las variables evaluadas a las ocho semanas de cultivo fueron:

- El porcentaje de formación de callo, el cual se calculó dividiendo el total de explantos que formaron callo por repetición entre el número de explantos cultivados y esta relación se multiplicó por cien.
- El porcentaje de formación de callo embriogénico, el cual se calculó dividiendo número de explantos que formaron callo con estructuras embriogénicas o embriones somáticos sobre su superficie, por repetición entre el total de explantos cultivados y esta relación se multiplicó por cien.

Las condiciones de cultivo utilizadas fueron temperatura de $28 \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$ y completa oscuridad.

Experimento 2. *Efecto del medio de cultivo y de la concentración de sacarosa en la inducción de embriogénesis somática en guayabo.*

Con el objetivo de evaluar el efecto del medio de cultivo y de la concentración de sacarosa en la inducción de embriogénesis somática a partir embriones cigóticos inmaduros de guayabo, se realizó un experimento bifactorial. El primer factor lo constituyeron cuatro medios de cultivos: MS, MS a mitad de la concentración de sus macroelementos, WPM (McCown y Lloyd, 1981) y B5 (Gamborg *et al.*,

1968); y el segundo factor lo constituyeron dos concentraciones de sacarosa: 30 y 60 g.L⁻¹.

Todos los medios de cultivo fueron suplementados con 1 mg.L⁻¹ de 2,4-D, 400 mg.L⁻¹ de L-glutamina, 100 mg.L⁻¹ de ácido ascórbico y gelificado con 2,4 g.L⁻¹ de Phytigel[®] (Sigma-Aldrich[®]).

El total de tratamientos fue de ocho y el número de repeticiones también fue de ocho por cada tratamiento. Cada repetición estuvo constituida por cinco viales con un embrión cigótico en etapa de torpedo-elongado o cotiledonar. Después de ocho semanas de cultivo se evaluaron las variables porcentaje de formación de callo, porcentaje de formación de callo embriogénico y porcentaje de masas pro-embriogénicas. De acuerdo con Merkle (1995), las masas pro-embriogénicas son estructuras nodulares muy compactas, friables, de color pardo claro que se desarrollan sobre la superficie del explanto, y que se diferencian del callo embriogénico en que éste es completamente friable.

Los porcentajes de formación de callo, callo embriogénico y masas pro-embriogénicas se calcularon de igual manera que en el experimento 1.

Las condiciones de cultivo empleadas fueron iguales a las del experimento 1.

III.6. Embriogénesis secundaria y establecimiento de suspensiones embriogénicas en guayabo.

Experimento 3. *Efecto del 2,4-D y la L-glutamina en la multiplicación secundaria de embriones somáticos de guayabo.*

Los callos embriogénicos obtenidos en el experimento 2 de la fase de inducción de embriogénesis somática, fueron subcultivados dos veces cada seis semanas, en medio MS suplementado con 1 mg.L⁻¹ de 2,4-D, 400 mg.L⁻¹ de L-glutamina, 100 mg.L⁻¹ de ácido ascórbico, 60 g.L⁻¹ de sacarosa y gelificado con 2,4 g.L⁻¹ de Phytigel® (Sigma-Aldrich®).

Posteriormente, con el objetivo de determinar la concentración de 2,4-D y de L-glutamina adecuada para promover el mayor crecimiento y proliferación de embriones somáticos, se realizó un experimento factorial evaluando dos concentraciones de 2,4-D (1 y 2 mg.L⁻¹) y un control (sin 2,4-D), y dos concentraciones de L-glutamina (200 y 400 mg.L⁻¹). El medio de cultivo utilizado fue igual al descrito más arriba para los subcultivos.

El total de tratamientos fue de seis y se utilizaron diez repeticiones por tratamiento. Cada repetición estuvo constituida por un frasco biotecnológico con 25 mL de medio de cultivo y en cada frasco se sembraron cinco callos embriogénicos de $10 \pm 0,5$ mg de peso cada uno, los cuales fueron pesados en una balanza analítica (OHAUS, Voyager, N.J. EEUU), a los cuales se les eliminó antes del pesaje los embriones somáticos en estado torpedo, torpedo-elongado y cotiledonar.

Después de seis semanas de cultivo se evaluó el número de embriones somáticos por callo, así como la cantidad de embriones somáticos en estado globular, torpedo y cotiledonar. Las condiciones de cultivo empleadas en este experimento fueron iguales a las descritas para el experimento 1.

Experimento 4. *Establecimiento de suspensiones embriogénicas a partir de callos embriogénicos de guayabo.*

Para establecer suspensiones embriogénicas de guayabo se inocularon ocho Erlenmeyer de 25 mL de capacidad, con aproximadamente $25 \pm 0,8$ mg de peso fresco de callo con estructuras embriogénicas (OHAUS, Voyager, N.J. EEUU), al cual previamente se le eliminaron los embriones somáticos en estado torpedo, torpedo-elongado y cotiledonar visibles en la superficie (figura 2 a). A cada Erlenmeyer se le agregaron 3 mL de medio de cultivo, con el fin de promover la separación de las células embriogénicas del callo. El medio de cultivo utilizado fue MS suplementado con 1 mg.L^{-1} de 2,4-D, 400 mg.L^{-1} de L-glutamina, 100 mg.L^{-1} de ácido ascórbico y 60 g.L^{-1} de sacarosa. Los Erlenmeyer se colocaron en un agitador orbital (New Brunswick, modelo Scientific, Environmental incubator shaker, N.J., EEUU) a 90 r.p.m., 28 ± 1 °C y en total oscuridad. Cada 10 días se renovó el medio de cultivo y se ajustó progresivamente la cantidad de medio de cultivo hasta 5 mL. Después de 56 días, todas las suspensiones se unificaron y se evaluaron dos medios de cultivo: el medio MS y el medio WPM, ambos en estado líquido y suplementados con 1 mg.L^{-1} de 2,4-D, 400 mg.L^{-1} de L-glutamina, 100 mg.L^{-1} de ácido ascórbico y 60 g.L^{-1} de sacarosa. Se multiplicaron tres suspensiones de cada tratamiento en Erlenmeyer de 125 ml con 20 mL de medio de cultivo y un volumen de células sedimentadas (VCS) inicial de 2 mL. El VCS se midió volcando en contenido de las suspensiones celulares sobre un tubo cónico graduado (figura 2 b) y se dejó decantar la suspensión durante 2 min antes de proceder a hacer la lectura de la medición. Cada 14 días durante un periodo de 56 días se evaluó el VCS, el volumen de medio cultivo consumido y su contenido de sacarosa. Una vez realizadas las mediciones se completó el medio de cultivo consumido con medio fresco hasta 20 mL. El contenido de sacarosa

se midió en grados Brix ($^{\circ}\text{Bx}$) o porcentaje de sacarosa por cada 100 mL de medio de cultivo. Para determinar los $^{\circ}\text{Bx}$ se tomó una muestra de 20 μL de medio de cultivo y se midió en un refractómetro digital (Reichert modelo Arias 500, N.Y., EEUU) a una temperatura controlada de 25°C. Al final del experimento se realizaron las curvas de VCS, volumen de medio de cultivo consumido y contenido de sacarosa en el medio de cultivo.

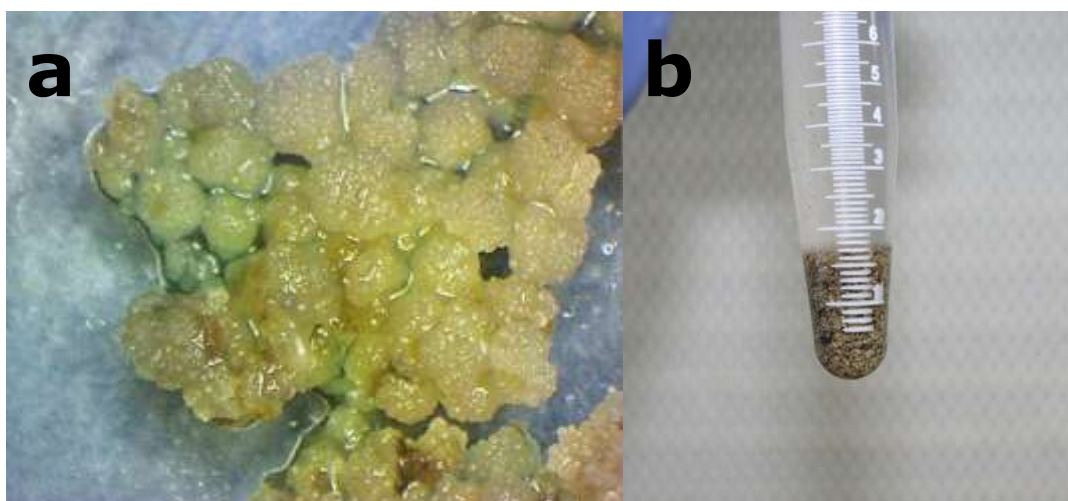


Figura 2. Establecimiento de suspensiones celulares embriogénicas de guayabo cv. "Enana Roja Cubana EEA-1840". a) Callo embriogénico obtenido de la fase de inducción de embriogénesis. b) Medición de VCS.

Experimento 5. *Efecto de la densidad de cultivo estimada como volumen de células sedimentadas sobre la cinética de crecimiento de suspensiones celulares embriogénicas de guayabo.*

El efecto de la densidad de cultivo, estimada como el VCS, sobre la cinética de crecimiento de suspensiones celulares embriogénicas de guayabo, se determinó evaluando tres densidades de células (2,5%, 5% y 10% de VCS) respecto al volumen total de trabajo, que fue de 15 mL de medio de cultivo. El experimento se inició a partir de las suspensiones celulares obtenidas en el medio de cultivo MS del experimento 4. Este material se pasó a través de una malla de acero inoxidable de 1000 μm y, empleando una lupa estereoscópica

(MOTIC, modelo SMZ 168 TL, HK, Japón), se recuperó la fracción de agregados embriogénicos y embriones globulares agrupados de tamaño mayor a 1000 μm (figura 3), descartando los embriones somáticos en estados de desarrollo más avanzados. De cada una de las densidades evaluadas se realizaron cuatro repeticiones en Erlenmeyer de 50 mL de volumen total. El medio de cultivo utilizado fue el MS a la mitad de la concentración de sus macroelementos, suplementado con 1 mg.L^{-1} de 2,4-D, 400 mg.L^{-1} de L-glutamina, 100 mg.L^{-1} de ácido ascórbico y 60 g.L^{-1} de sacarosa. Las condiciones experimentales fueron iguales a las descritas para el establecimiento de las suspensiones celulares (experimento 4).



Figura 3. Fracción de agregados embriogénicos y embriones globulares >1000 μm , empleados para la multiplicación de suspensiones celulares embriogénicas de guayabo cv. "Enana Roja Cubana EEA-1840".

El medio de cultivo no se renovó durante los 49 días que duró el experimento. Para la confección de las curvas de crecimiento celular se procedió de la siguiente forma: cada siete días, durante el tiempo de evaluación, se volcó el contenido de cada Erlenmeyer sobre tubos cónicos graduados y los residuos de agregados celulares adheridos a los Erlenmeyer se lavaron con medio de la suspensión. Se dejó decantar durante 2 min y se midió el VCS y el contenido de sacarosa en el medio de cultivo, expresado en $^{\circ}\text{Bx}$. Para medir el contenido de

sacarosa del medio de cultivo se siguió el procedimiento descrito en el experimento 4.

Al final del experimento se realizaron las curvas del VCS, del contenido de sacarosa del medio de cultivo y se determinaron las siguientes variables:

- El peso fresco, el cual se calculó vertiendo 2 mL de cada suspensión en un tubo eppendorf[®] de 2 mL previamente pesado en una balanza analítica (OHAUS, modelo Voyager, N.J., EEUU), este peso constituyó el peso inicial del tubo. Después el tubo eppendorf[®] se centrifugó (Eppendorf[®], modelo 5424, N.Y., EEUU) a 6000 *g* durante 3 min y con ayuda de una micropipeta se descartó el sobrenadante, pesando nuevamente el tubo eppendorf[®], este peso constituyó el peso final del tubo. El peso fresco, expresado en mg.mL^{-1} de medio de cultivo, lo constituyó la diferencia entre peso final e inicial del tubo dividida entre dos.
- El peso seco se calculó tomando el tubo eppendorf[®] utilizado para calcular el peso fresco y sometiéndolo a secado en estufa a 70°C durante 48 h. El peso seco, expresado en mg.mL^{-1} de medio de cultivo lo constituyó la diferencia entre el peso después del secado y el peso del tubo eppendorf[®] dividido entre dos.
- El porcentaje de humedad se calculó dividiendo la diferencia entre el peso fresco y el peso seco, entre el peso seco y multiplicando este resultado por cien.
- El porcentaje de materia seca el cual se calculó dividiendo el peso seco entre el peso fresco y multiplicando este resultado por cien.

III.7. Maduración y germinación de embriones somáticos de guayabo.

Experimento 6. *Efecto de la concentración del ácido abscísico sobre la maduración de embriones somáticos de guayabo.*

A fin de evaluar el efecto de la concentración de ácido abscísico (ABA) sobre la maduración de embriones somáticos de guayabo, en un experimento aleatorizado se evaluaron dos concentraciones de ABA, (0,5 y 1 mg.L⁻¹) y un control (sin ABA). El medio de cultivo utilizado fue el MS a la mitad de la concentración de los macroelementos, 30 g.L⁻¹ de sacarosa y solidificado con 4 g.L⁻¹ de Agargel (Sigma-Aldrich®). Para cada tratamiento se utilizaron diez repeticiones, constituyendo cada repetición un frasco biotecnológico con 25 mL de medio de cultivo y 25 mg de material embriogénico, constituido por callo embriogénico con embriones en etapa globular y masas pro-embriogénicas (figura 4).

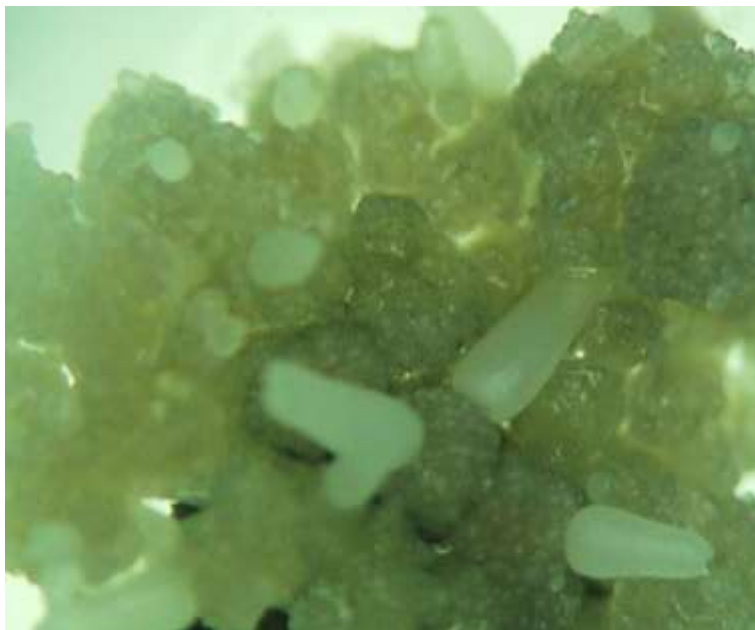


Figura 4. Aspecto general del material embriogénico utilizado para la etapa de maduración de embriones somáticos de guayabo cv. "Enana Roja Cubana EEA-1840".

Después de seis semanas de cultivo, se evaluó el número de embriones somáticos blanco-opacos en etapa torpedo-elongado y cotiledonar. El uso la apariencia blanca-opaca de los embriones somáticos como criterio de la maduración de los embriones somáticos se ha indicado en varias especies (Cailloux *et al.*, 1996; Garin *et al.*, 2000; Norgaard, 1997; Perán-Quesada *et al.*, 2004) y las etapas torpedo-elongado y cotiledonar se han reportado como las más adecuadas para iniciar la fase de germinación en guayabo (Rai *et al.*, 2008).

Los cultivos *in vitro* se mantuvieron en una cámara de crecimiento, bajo luz blanca fluorescente continua con una irradiancia de $200 \mu\text{mol}^{-1}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$, temperatura de $26 \pm 1^\circ\text{C}$ y humedad relativa promedio de 46 %.

Experimento 7. *Efecto de la concentración de sacarosa y del medio de cultivo sobre la germinación de embriones somáticos de guayabo.*

Para evaluar el efecto de la concentración de sacarosa y del medio de cultivo sobre la germinación de embriones somáticos de guayabo, se estableció un experimento factorial, cuyo primer factor de estudio fue la concentración de sacarosa (30 y 50 g.L^{-1}) del medio de cultivo y como segundo factor se estudió la concentración de macronutrientes del medio MS (50 y 100 %). Los medios de cultivo fueron suplementados con $0,25 \text{ mg.L}^{-1}$ de N^6 -bencilaminopurina (6-BAP), $0,01 \text{ mg.L}^{-1}$ de DI-31 (análogo de brasinoesteroide $\text{C}_{27}\text{H}_{42}\text{O}_5$, equivalente al Biobras-16) de acuerdo a lo indicado por Vilchez *et al.* (2004b) y solidificado con 4 g.L^{-1} de Agargel (Sigma-Aldrich®).

Para cada tratamiento se utilizaron doce repeticiones, constituyendo cada repetición un frasco biotecnológico con 25 mL de medio de

cultivo y cinco embriones maduros en estado cotiledonar. Después de ocho semanas de cultivo, se evaluó el porcentaje de germinación por repetición, calculado de la siguiente manera: total de embriones germinados dividido entre el total de embriones sembrados y esta relación multiplicada por cien. En este experimento se consideró como embrión germinado aquellos embriones somáticos que cambiaron de color de blanco-opaco a verde, presentaron el desarrollo del eje caulinar, hojas cotiledonares y eje radicular.

Las condiciones de cultivo fueron iguales a las empleadas en el experimento 6.

Experimento 8. *Comparación de la germinación de embriones somáticos de guayabo en sistemas de inmersión temporal y en medio semisólido.*

Para comparar la germinación de embriones somáticos de guayabo, en sistemas de inmersión temporal y en medio semisólido, se utilizó el sistema de inmersión temporal RITA[®] (Recipiente de Inmersión Temporal Automatizado, CIRAD-Francia, distribuido por VITROPIC, Francia. figura 5 a), cuyo funcionamiento y características son descritas por Etienne y Berthouly (2002), Martre *et al.* (2001) y Georgiev *et al.* (2014). Se emplearon tres RITA[®] de 0,9 L de capacidad cada uno, con 200 mL de medio de cultivo. Cada RITA[®] se inoculó con 200 mg de embriones somáticos y el control del experimento lo constituyeron cinco frascos biotecnológicos de 200 mL de capacidad, con 25 mL de medio de cultivo solidificado con 4 g.L⁻¹ de Agargel (Sigma-Aldrich[®]), en los cuales se inocularon 25 mg de embriones somáticos. La relación (peso.volumen⁻¹) entre la cantidad de inóculo y volumen de medio de cultivo fue de 1 mg de inóculo.mL⁻¹ de medio de cultivo, en ambos tratamientos.

En este experimento se utilizaron embriones somáticos maduros blanco-opacos en etapa de desarrollo torpedo, torpedo-elongado y cotiledonar (figura 5 a), provenientes de la fase de maduración realizada en RITA[®]. Los embriones somáticos provenientes de la fase de proliferación en medio líquido (resultados del experimento 5) se cultivaron por cuatro semanas en RITA[®] con un tiempo y frecuencia de inmersión de 1 min cada 8 h. La densidad de inóculo utilizada en los RITA[®] en la fase de maduración fue 500 mg de conglomerados de embriones somáticos en etapa globular. El medio de cultivo utilizado en esta fase fue el MS a la mitad de la concentración de los macroelementos y 30 g.L⁻¹ de sacarosa.

El medio de germinación fue el MS a la mitad de la concentración de los macroelementos, suplementado con 0,25 mg.L⁻¹ de 6-BAP; 0,01 mg.L⁻¹ de DI-31 y 30 g.L⁻¹ de sacarosa. Luego de ocho semanas de cultivo se evaluó el número de embriones somáticos con desarrollo normal (embriones que presentaron el desarrollo del eje caulinar, hojas cotiledonares y eje radicular, figura 5 b), caulinar (embriones que presentaron el desarrollo solo del eje caulinar y hojas cotiledonares, sin visible meristemo radicular activo, figura 5 c) y radicular (embriones que presentaron el desarrollo solo del eje radicular, sin meristemo apical activo, figura 5 d).

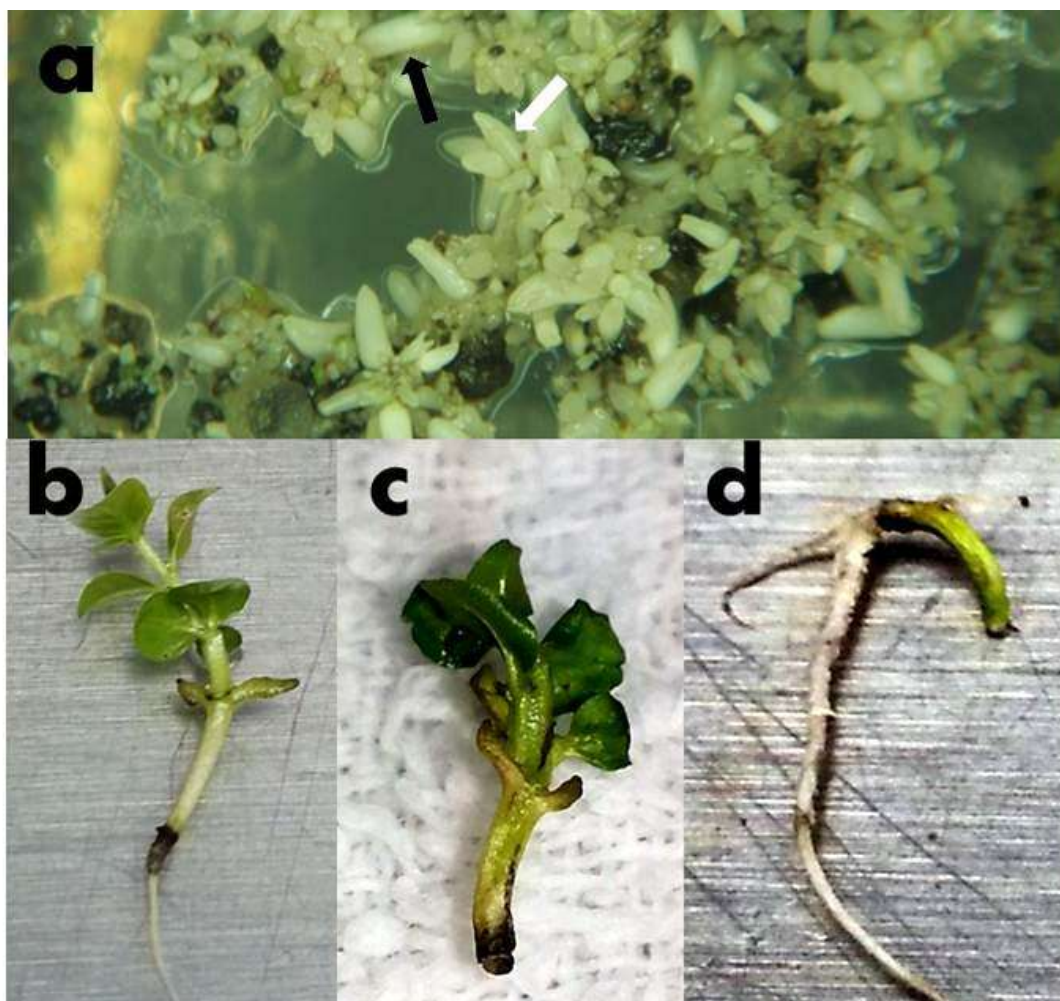


Figura 5. Aspecto general de la germinación de embriones somáticos de guayabo cv. "Enana Roja Cubana EEA-1840" en sistema de inmersión temporal (RITA®). (a) embriones somáticos en etapa torpedo (flecha blanca) y cotiledonar (flecha negra) empleados para inocular los RITA®, (b) embriones somáticos con germinación normal, (c) caulinar, (d) radicular.

Las condiciones de cultivo fueron iguales a las empleadas en el experimento 6.

Experimento 9. *Determinación de los parámetros tiempo y frecuencia de inmersión para la germinación de embriones somáticos de guayabo en sistemas de inmersión temporal.*

A fin de establecer los parámetros tiempo y frecuencia de inmersión adecuados, para la germinación de los embriones somáticos en sistemas de inmersión temporal, se evaluaron mediante un

experimento factorial, cuatro tratamientos resultantes de la combinación de dos tiempos de inmersión (1 y 2 min) y dos frecuencias de inmersión (cada 12 h y 8 h). Se utilizaron tres repeticiones por tratamiento y cada repetición la constituyó un RITA® de 0,9 L de capacidad; cada uno con 200 mL de medio de cultivo e inoculado con 250 mg de embriones somáticos. El estado de desarrollo de los embriones empleados, el medio de cultivo utilizado, así como, las condiciones de cultivo fueron iguales a las descritas en el experimento 8.

A las ocho semanas de cultivo, además de evaluar las variables señaladas en el experimento 8, se determinó en el medio de cultivo, el pH y la diferencia entre el contenido al inicio y final del experimento, de sacarosa y de sales minerales. Estos últimos parámetros se determinaron como medidas indirectas para estimar el consumo de sacarosa (Adelberg y Toler, 2004; Adelberg, 2005) y de sales minerales, por los embriones somáticos en la fase de germinación. El contenido de sacarosa se midió al inicio y final del experimento siguiendo el procedimiento descrito en el experimento 4. El contenido sales minerales en el medio de cultivo se midió con un potenciómetro (OAKTON, modelo pH/CON 510 series) como conductividad eléctrica en microSiemens.m⁻¹ (μS.m⁻¹) al inicio y final del experimento. El pH se midió directamente en el medio de cultivo con el potenciómetro.

Experimento 10. *Efecto de la densidad de inóculo inicial de embriones somáticos sobre la germinación en sistemas de inmersión temporal.*

Se estudió el efecto de dos densidades de inóculo: 250 y 500 mg de embriones somáticos blancos-opacos en etapa torpedo-elongado y cotiledonar. Por cada densidad estudiada se utilizaron cuatro RITA®.

El tiempo y frecuencia de inmersión fue de 1 min cada 12 h. El tiempo de evaluación, así como las variables evaluadas y el medio de cultivo utilizado, fueron iguales a los descritos en el experimento 9.

Experimento 11. *Comparación de la germinación de embriones de guayabo en sistemas de inmersión temporal y en envase de cultivo con ventilación forzada.*

Para comparar el efecto de ventilación forzada sobre la germinación de embriones somáticos de guayabo, se evaluaron dos tipos de envases con ventilación forzada: sistemas de inmersión temporal tipo RITA[®], envases de vidrio de 500 mL de capacidad con ventilación forzada (ECCVF) y, como control, envases de vidrio de 500 mL de capacidad sin ventilación forzada (ECSVF). Los ECCVF se construyeron realizando orificios de entrada y salida de aire en la tapa, donde se conectaron filtros de membrana PTFE de 0,2 μm , mediante mangueras de silicón. El tiempo y frecuencia de la ventilación forzada fue de 1 min cada 12 h. Iguales parámetros fueron utilizados para los RITA[®]. A los ECCVF y ECSVF se les adicionó 50 mL de medio de cultivo gelificado con 4 g.L^{-1} de Agargel (Sigma-Aldrich[®]), mientras que a los RITA[®] se les adicionó 200 mL de medio de cultivo líquido. El estado de desarrollo de los embriones empleados, el medio de cultivo utilizado, así como las condiciones de cultivo fueron iguales a las descritas en el experimento 8.

Los tratamientos se dispusieron en un diseño completamente aleatorizado, con cuatro repeticiones (envases de cultivo) y en cada repetición se inocularon 500 mg de embriones somáticos. Después de ocho semanas de cultivo se evaluó el número de embriones somáticos con desarrollo normal, caulinar y radicular.

III.8. Conversión en plantas de los embriones somáticos de guayabo.

Experimento 12. *Comparación del crecimiento en vivero de vitroplantas provenientes de embriogénesis somática y de plantas de semilla.*

Para comparar del crecimiento en vivero entre plántulas y vitroplantas de guayabo cv. "Enana Roja Cubana EEA-1840", se utilizaron vitroplantas obtenidas vía germinación de embriones somáticos del experimento 10. Las plántulas se obtuvieron a partir de semillas extraídas de un fruto de guayaba en estado de madurez de consumo, al cual se le extrajeron las semillas. Las semillas se secaron a la sombra por 48 h y luego se embebieron por 24 h en agua destilada, antes de ser sembradas.

Tanto las vitroplantas como las plántulas se sembraron en bandejas de plástico de 75 orificios. El sustrato lo constituyó una mezcla de abono de río y arena lavada de río, en proporción 3:1. El abono de río es un sustrato constituido por sedimentos orgánicos que se acumulan en las desembocaduras de los ríos, los cuales son compostados para su utilización, mientras que la arena lavada es producto del desgaste de las piedras movidas por la corriente de los ríos y como componente del sustrato aporta un buen drenaje general, al homogeneizarse bien con el resto de los componentes del mismo. Una vez sembradas las bandejas se mantuvieron bajo condiciones de cámara húmeda por tres semanas, a una temperatura de 26 °C y 85% de humedad relativa.

Cuando las vitroplantas y plántulas, desarrollaron más de tres hojas verdaderas y una altura aproximada de 8 cm, fueron transferidas al invernadero para su endurecimiento. Después de una semana fueron

trasplantadas en bolsas plásticas de siembra de 3 L de capacidad con un sustrato constituido por estiércol de bovino y arena lavada, en proporción 2:1. El riego se realizó por goteo, con una frecuencia de tres veces al día y un tiempo de riego de 6 minutos (aproximadamente 4,5 L.día⁻¹ de agua de riego por bolsa). Se fertilizó semanalmente con una fórmula completa soluble (18-18-18 más microelementos, SOLUB[®]) a razón de 1 g de NPK.

Quincenalmente y hasta completar tres meses de evaluación, se cosecharon cinco plantas de cada tipo, las cuales se llevaron al laboratorio y se separaron en hojas, tallos, ramas y raíces. Estos órganos se pesaron por separado en una balanza de precisión (OHAUS modelo Explorer) para determinar el peso fresco y una vez realizado el pesaje, se midió el área foliar de las hojas en un medidor Delta T modelo MK2, luego se colocaron en bolsas de papel y se secaron en estufa a 70 °C durante 72 h, para determinar el peso seco por órgano. Con estos valores se calcularon los componentes fisiológicos de crecimiento: acumulación de peso seco, tasa de crecimiento del cultivo (TCC), índice de crecimiento relativo (ICR), tasa de asimilación neta (TAN) y área foliar. Con estos parámetros se realizaron curvas de estimación mediante el programa Curve Expert 1.4 (Hyams, 2005) y para determinar la significación estadística de las variables número de hojas, longitud del tallo y de la raíz al final del ciclo, se utilizó un ANADEV.

Fórmulas empleadas para el cálculo de los parámetros fisiológicos del crecimiento según Barrera *et al.*, (2010):

- Tasa de crecimiento del cultivo (TCC).

$$TCC = (P2 - P1 / t2 - t1) \times (1 / AS) = g. (cm^2 \text{ de suelo} \cdot \text{día})^{-1}$$

Dónde:

P1: Peso seco de muestra 1

P2: Peso seco de muestra 2

t1: Fecha de muestreo 1 expresado en días después del trasplante (ddt)

t2: Fecha de muestreo 2 expresado en ddt

AS: Área del suelo ocupada

▪ Índice de crecimiento del cultivo (ICR).

$$ICR = \ln P2 - \ln P1 / t2 - t1 = g.(g.día)^{-1}$$

Dónde:

Ln: Logaritmo Neperiano

P1: Peso seco de muestra 1

P2: Peso seco de muestra 2

t1: Fecha de muestreo 1 expresado en ddt

t2: Fecha de muestreo 2 expresado en ddt

▪ Tasa de asimilación neta (TAN).

$$TAN = ((P2 - P1) / (t2 - t1)) / ((\ln AF2 - \ln AF1) / (AF2 - AF1)) = g.(cm^2 \text{ de área foliar.día})^{-1}$$

Dónde:

Ln: Logaritmo Neperiano

P1: Peso seco de muestra 1

P2: Peso seco de muestra 2

t1: Fecha de muestreo 1 expresado en ddt

t2: Fecha de muestreo 2 expresado en ddt

AF1: Área foliar de la muestra 1

AF2: Área foliar de la muestra 2

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV.1. Inducción de embriogénesis somática en guayabo

Experimento 1. *Efecto de la auxina en la inducción de embriogénesis somática en guayabo a partir de embriones cigóticos inmaduros.*

En la tabla 1 se muestra el efecto de la interacción de los factores de estudio tipo y concentración de auxina, sobre los porcentajes de formación de callo y callo embriogénico obtenidos a partir de embriones cigóticos inmaduros de guayabo cv. "Enana Roja Cubana EEA-1840"; los cuales resultaron estadísticamente significativos ($P \leq 0,05$) en el ANADEVA. Después de ocho semanas de cultivo en el medio de inducción de embriones somáticos, se observó que ambos reguladores de crecimiento mostraron un efecto positivo en la inducción de embriogénesis somática. El uso de la concentración de 4 mg.L⁻¹ de 2,4-D provocó una disminución en el porcentaje de formación de callo y callo embriogénico, resultados también reportados para este cultivar por Vilchez *et al.* (2002). Esto pudiera estar asociado a un efecto tóxico por parte del regulador de crecimiento (Canhoto *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2002), mientras que con el uso de Dicamba no se observó una tendencia definida hacia la inducción de la embriogénesis somática en las concentraciones evaluadas. Los mayores valores de porcentaje de formación callo y callo embriogénico se alcanzaron con las concentraciones probadas de 2,4-D y con 4 mg.L⁻¹ de Dicamba.

Tabla 1. Efecto de la auxina sobre la inducción de embriogénesis somática en guayabo cv. "Enana Roja Cubana EEA-1840" a partir de embriones cigóticos inmaduros.

Auxina	Concentración (mg·L ⁻¹)	Porcentaje de formación de	
		Callo	Callo embriogénico
2,4-D	1	92,5 a	22,5 ab
	2	90,0 a	28,6 a
	4	45,0 b	20,0 ab
Dicamba	1	52,5 b	10,0 b
	2	35,0 b	15,0 b
	4	90,0 a	25,7 a

Los valores indicados con distintas letras difieren estadísticamente ($P \leq 0,05$) para la prueba LSD de comparación de medias. Valores reales de porcentajes han sido transformados por $(X+0,5)^{1/2}$.

Karami y Saidi (2010) y Zavattieri *et al.* (2010) señalan que la inducción de embriogénesis somática en tejidos vegetales es el resultado de distintos tipos de estrés aplicados a los mismos a través de los medios y condiciones de cultivo. En ese sentido, Fehér *et al.* (2003) y Gaj (2004) sugieren que el 2,4-D es un regulador de crecimiento sintético, que influye en el metabolismo de las auxinas endógenas, participando significativamente en la adquisición de la competencia embriogénica de la célula vegetal, promoviendo de esta manera la formación de embriones somáticos. El efecto estresante del 2,4-D probablemente deriva de su acción de hipermetilación del ADN nuclear (Zavattieri *et al.*, 2010; Fraga *et al.*, 2012). De hecho, se ha reportado que altas concentraciones de 2,4-D aumentaron los niveles de metilación del ADN en diferentes cultivos *in vitro* (Karami y Saidi, 2010). Fraga *et al.* (2012) consideran que la metilación del ADN es un proceso indispensable para iniciar la embriogénesis somática. El ADN metilado por efecto del 2,4-D genera cambios dinámicos en la cromatina, que conducen a la reprogramación genómica de las células somáticas y de cientos de genes necesarios para la adquisición de la expresión de la competencia embriogénica

en la célula vegetal (Karami y Saidi, 2010). Sin embargo, un alto grado de metilación del ADN tiene el efecto indeseable de inducir variación somaclonal, que puede persistir en las plantas regeneradas y puede transmitirse a su progenie (Sharma *et al.*, 2007).

El 2,4-D es considerado el regulador del crecimiento sintético más eficiente utilizado en la mayoría de los sistemas de cultivos embriogénicos (Fehér *et al.*, 2003; Karami y Saidi, 2010). El papel de las auxinas, como principales reguladores del crecimiento en la inducción de la embriogénesis somática, está muy bien documentado en la literatura para muchas especies leñosas (Dustan *et al.*, 1995; Jain *et al.*, 2000; Jain y Gupta, 2005), incluyendo varios miembros de la familia Myrtaceae (Canhoto *et al.*, 1999; Nugent *et al.*, 2001; Guerra *et al.*, 2001; Stefanello *et al.*, 2005; Guerra *et al.*, 2013; Pinto *et al.*, 2013).

Existen pocas investigaciones en Myrtaceae donde se haya evaluado el empleo de Dicamba, solo o en combinación con otros reguladores de crecimiento, para inducir la embriogénesis somática y en las mismas no se reportan resultados efectivos para dicho objetivo (Nugent *et al.*, 2001; Pinto *et al.*, 2002; Cangahuala-Inocente *et al.*, 2007a). Sin embargo, los resultados aquí presentados resultan prometedores para la inducción de embriogénesis somática en guayabo, además de constituir la primera investigación donde se emplea para tal fin en esta especie. Sin embargo, con el uso de concentraciones más bajas de 2,4-D se alcanzaron valores similares en la formación de callo y callo embriogénico. Por esa razón, los estudios se continuaron con el uso del 2,4-D.

Las concentraciones de 2,4-D evaluadas en este experimento, coinciden con la reportadas como las favorables para la inducción de embriogénesis en otras especies de la familia Myrtaceae (Canhoto *et*

al., 1999; Guerra *et al.*, 2001; Stefanello *et al.*, 2005; Cangahuala-Inocente *et al.* 2007a y 2007b; Prakash y Gurumurthi, 2010; Gómez *et al.*, 2013) y para el guayabo (Akhtar *et al.*, 2000; Chandra *et al.*, 2004; Vilchez *et al.*, 2002, 2004b; Rai *et al.*, 2007; Ferrerira y Yoshimitsu 2009; Akhtar, 2010, 2012, 2013a, 2013b).

La formación esporádica de algunos embriones somáticos en este experimento, estuvo relacionada con el agotamiento de la auxina exógena (Pasternak *et al.*, 2002; Fehér *et al.*, 2003). Una vez que disminuye la concentración, deja de existir el efecto exógeno y se promueve el desarrollo de células o grupos de células potencialmente capaces de diferenciarse en estructuras embrionarias (von Arnold *et al.*, 2002). Sin embargo, no toda la superficie del callo, ni todos los callos formados, fueron capaces de diferenciar embriones somáticos. Esto pudo deberse a que la competencia embriogénica está determinada fundamentalmente por la sensibilidad de las células potenciales a las auxinas aplicadas de manera exógena (Dustan *et al.*, 1995).

Morfológicamente se observó que después de 7 días en los medios de inducción, los embriones cigóticos inmaduros cambiaron su color de blanco-opaco a crema amarillento e incrementaron su volumen. Aproximadamente a los 25 días, se observó la formación de un callo de color marrón oscuro en la superficie en contacto con el medio de cultivo y de otro color marrón claro brillante, bastante friable y con algunos embriones aislados en diferentes etapas de desarrollo (figura 6 a), que posteriormente, hacia los 45-50 días, mostraron algunas zonas con callo nodular, friable al tacto y de color pardo-castaño claro, denominado y cuantificado en este estudio como callo embriogénico (figura 6 b). Las diferentes coloraciones y tonalidades observadas en el callo inicial, son semejantes a las reportadas por Akhtar (2010) en la fase de inducción de embriogénesis somática de

guayabo cv. "Allahabad Safeda" y según este autor pudieran reflejar la formación de un gradiente de concentraciones de 2,4-D entre las diferentes capas de células; lo cual requiere de una investigación bioquímica.

Sobre la superficie del callo embriogénico fue posible observar estructuras globulares traslúcidas semejantes a embriones, que de manera aislada y eventual, mostraron un desarrollo morfológico diferente, identificándose como embriones somáticos en etapas torpedo y cotiledonar (figura 6 c). En algunos casos, en el callo embriogénico se desarrollaron estructuras nodulares muy compactas, friables, de color pardo claro (figura 6 d). Este tipo de tejido o callo, también denominado "masas celulares pro-embriogénicas" (Merkle, 1995), se reconoce como un elemento esencial para alcanzar procesos morfogenéticos con altas frecuencias de regeneración en especies leñosas (von Arnold *et al.*, 2002).

En el guayabo, la información que existe sobre las características morfológicas de los tejidos formados durante la embriogénesis somática *in vitro*, es escasa y está dirigida fundamentalmente a la diferenciación de embriones somáticos (Akhtar *et al.*, 2000). Vilchez *et al.* (2002), al utilizar embriones cigóticos inmaduros del cv. "Enana Roja Cubana EEA-1840" y cultivarlos con 1 mg.L⁻¹ de 2,4-D reportaron que durante las primeras dos semanas se formó un callo compacto, seco, de color marrón brillante y con estructuras embriogénicas, que guarda relación con el tejido descrito en este experimento.

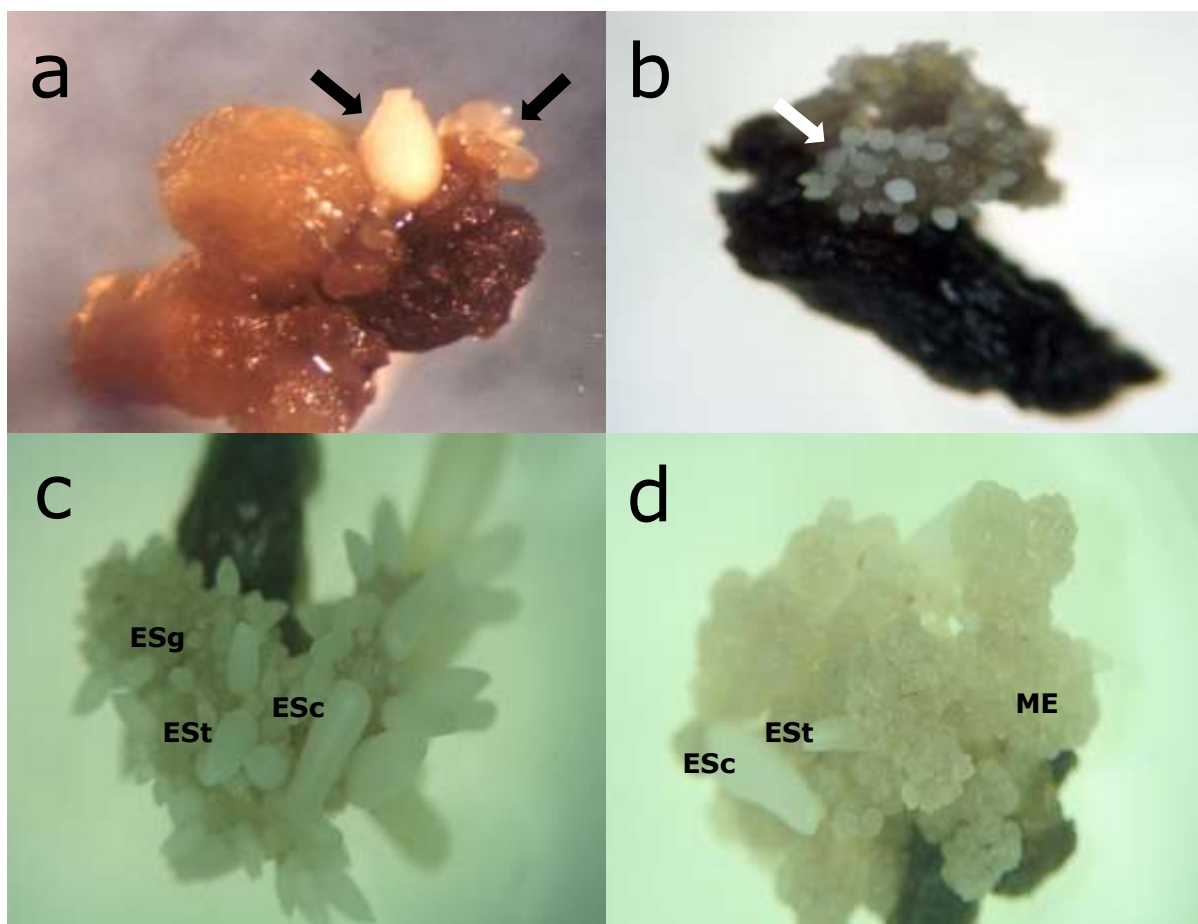


Figura 6. Principales características morfológicas de los callos obtenidos durante la inducción de embriogénesis somática en embriones cigóticos inmaduros de guayabo cv. "Enana Roja Cubana EEA-1840". a) Callo friable de color marrón claro formado a los 25 días de cultivo. Se observa la presencia de embriones somáticos en parte de su superficie (flecha). b) Callo embriogénico con abundantes estructuras embriogénicas (flecha), compacto nodular, friable y de color pardo-castaño claro formado hacia los 45-50 días. c) Callo embriogénico con embriones somáticos en diferentes etapas de desarrollo ESg: embrión somático globular, ESt: embrión somático torpedo y ESc: embrión somático cotiledonar. d) Estructuras nodulares muy compactas friables, de color pardo claro correspondientes morfológicamente a masas celulares pro-embriogénicas (ME).

El estudio histológico de los tejidos realizado durante la inducción de la embriogénesis somática en guayabo cv. "Enana Roja Cubana EEA-1840" en medio de cultivo con 1 mg.L^{-1} de 2,4-D, mostró que hacia los 10 días de cultivo fueron evidente las etapas iniciales de la formación de un callo, probablemente originado a partir de los tejidos epidérmicos y sub-epidérmicos del embrión cigótico inmaduro, evidenciado en los cortes histológicos longitudinales realizados a los

mismos (Figura 7 a). Hacia los 25 días fue posible diferenciar histológicamente la existencia de callo friable y sobre la periferia de este se observó tejido embriogénico (figura 7 b) caracterizado por presentar divisiones celulares anticlinales y periclinales y células meristemáticas isodiamétricas de pequeño tamaño ($<30\text{ }\mu\text{m}$) núcleo prominente y fuertemente teñidas (figura 7 c), lo que indica un alto contenido de material proteico que, de acuerdo con Michaux-Ferrière *et al.* (1992), se trata de nucleoproteínas producto de la elevada tasa de división celular existente.

Según Sharp *et al.* (1983), los embriones somáticos pueden originarse a partir de dos tipos de células: las pre-embriogénicamente determinadas PEDC (por sus siglas en el idioma inglés, pre-embryogenic determined cells) y las células determinadas embriogénicamente inducidas IEDC (por sus siglas en el idioma inglés, induced embryogenic determined cells). En el caso del guayabo, aunque los embriones cigóticos pudieran considerarse tejido PEDC, la embriogénesis somática fue indirecta y de baja frecuencia, ya que se observó una etapa intermedia de formación de callo previo a la formación de estructuras embriogénicas. El origen unicelular de los embriones somáticos es generalmente asociado a procesos de embriogénesis somática directa, mientras que un origen celular variado se asocia frecuentemente a una embriogénesis somática indirecta (Quiroz-Figueroa *et al.*, 2002), lo cual concuerda con los resultados del guayabo. Las características observadas en el callo embriogénico coinciden con las descritas para otras Myrtaceae como *Acca sellowiana* (Pescador *et al.*, 2008) *Feijoa sellowiana* Berg. (Canhoto *et al.*, 1996; Dal Vesco, 1998) y *Myrtus communis* L. (Canhoto *et al.*, 1999).

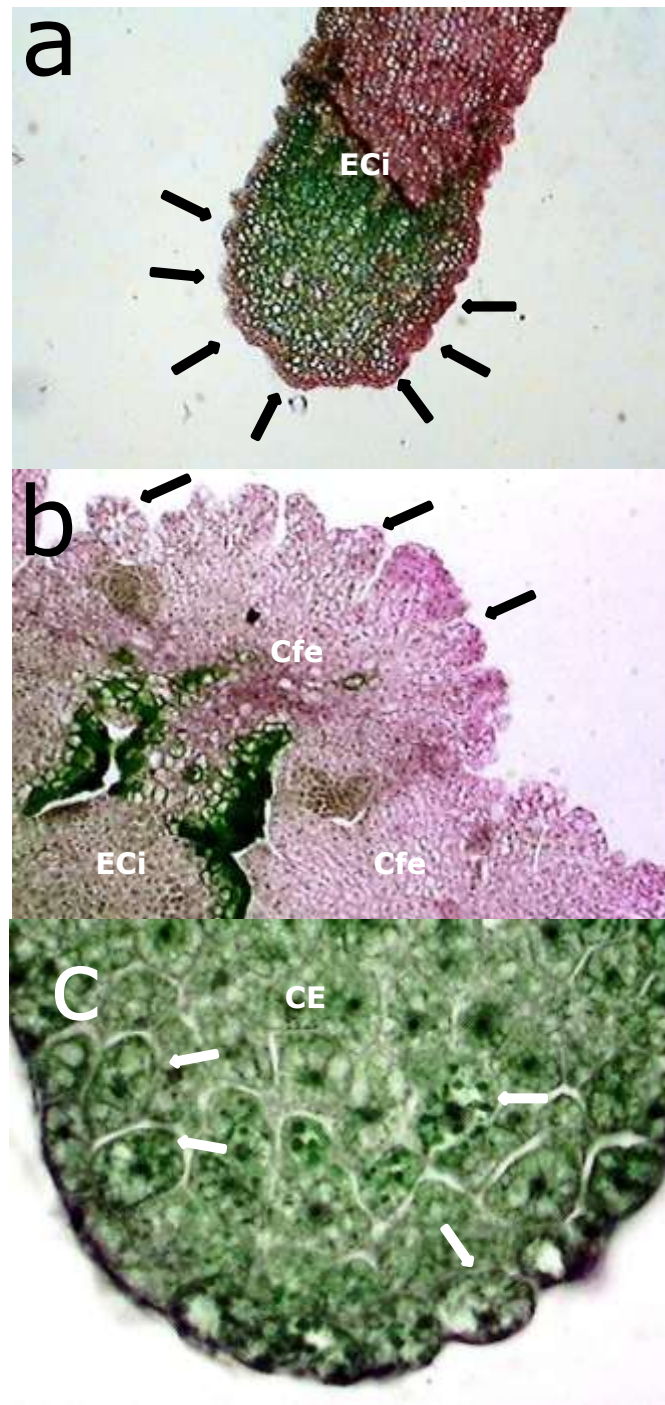


Figura 7. Histología de la inducción de embriogénesis somática en guayabo cv. "Enana Roja Cubana EEA-1840". a) Embrión cigótico inmaduro (ECi) a los 10 días de cultivo en medio de inducción de embriogénesis, las flechas negras indican formación de callo por debajo de la epidermis en el extremo basal (10X). b) Embrión cigótico inmaduro (ECi) a los 25 días de cultivo en medio de inducción de embriogénesis somática, con callo friable (Cfe) con estructuras embriogénicas (flechas negras) (10X) y c) Callo embriogénico (CE) con células meristemáticas (flechas blancas) a los 45-50 días en medio de inducción de embriogénesis (40X).

Experimento 2. *Efecto del medio de cultivo y de la concentración de sacarosa en la inducción de embriogénesis somática en guayabo.*

Después de ocho semanas de cultivo el ANADEVA detectó diferencias estadísticas para los porcentajes de formación de callo embriogénico y masas pro-embriogénicas ($P \leq 0,05$) entre las distintas combinaciones de medio de cultivo y concentraciones de sacarosa ensayadas (tabla 2). Estos resultados difieren de los reportados por Biswas *et al.* (2005) quienes no obtuvieron embriones somáticos en los medios de cultivo MS, B5 o N6.

Tabla 2. *Efecto del medio de cultivo y la concentración de sacarosa sobre el porcentaje de formación de callo, callo embriogénico y masas pro-embriogénicas, en la inducción de embriogénesis somática en guayabo cv. "Enana Roja Cubana EEA-1840".*

Medio de cultivo	Concentración de Sacarosa g.L ⁻¹	Callo	Porcentaje de formación de	
			Callo embriogénico	Masas pro-embriogénicas
MS ¹ / ₂	30	97,5 ns	22,5 bc	27,5 bc
MS ¹ / ₂	60	100,0 ns	19,2 bc	31,6 bc
MS	30	97,5 ns	35,0 abc	35,0 abc
MS	60	100,0 ns	59,6 a	36,3 abc
WPM	30	95,5 ns	20,6 bc	46,3 ab
WPM	60	100,0 ns	45,0 ab	55,0 a
B5	30	99,9 ns	20,0 bc	42,5 ab
B5	60	100,0 ns	5,7 c	17,1 c

Los valores indicados con distintas letras difieren estadísticamente ($P \leq 0,05$) para la prueba Tukey de comparación de medias. ns: no significativo. Valores reales de porcentajes han sido transformados por $(X+0,5)^{1/2}$.

Todas las combinaciones de medios de cultivo y concentración de sacarosa evaluadas mostraron ser eficientes para la formación de callo a partir de embriones cigóticos de guayabo. Los porcentajes de formación de callo oscilaron entre el 95,5 % y el 100 %, resultando sin significación estadística en el ANADEVA (tabla 2).

Los mayores valores de callo embriogénico, se obtuvieron con la combinación 60 g.L⁻¹ de sacarosa y el medio de cultivo MS (figura 8 a); aunque dicho valor no difirió estadísticamente de las combinaciones de medio MS y 30 g.L⁻¹ de sacarosa y medio de cultivo WPM y 60 g.L⁻¹ de sacarosa. Para el porcentaje de masas pro-embriogénicas las combinaciones de medio de cultivo MS y 30 ó 60 g.L⁻¹ de sacarosa, medio de cultivo WPM y 30 ó 60 g.L⁻¹ de sacarosa, y medio de cultivo B5 y 30 g.L⁻¹ de sacarosa (figura 8 c) fueron similares estadísticamente; pero entre ellas sobresalió la combinación de medio WPM y 60 g.L⁻¹ de sacarosa (figura 8 b), con la que se obtuvo el mayor porcentaje de formación de masas pro-embriogénicas (55,0 %).

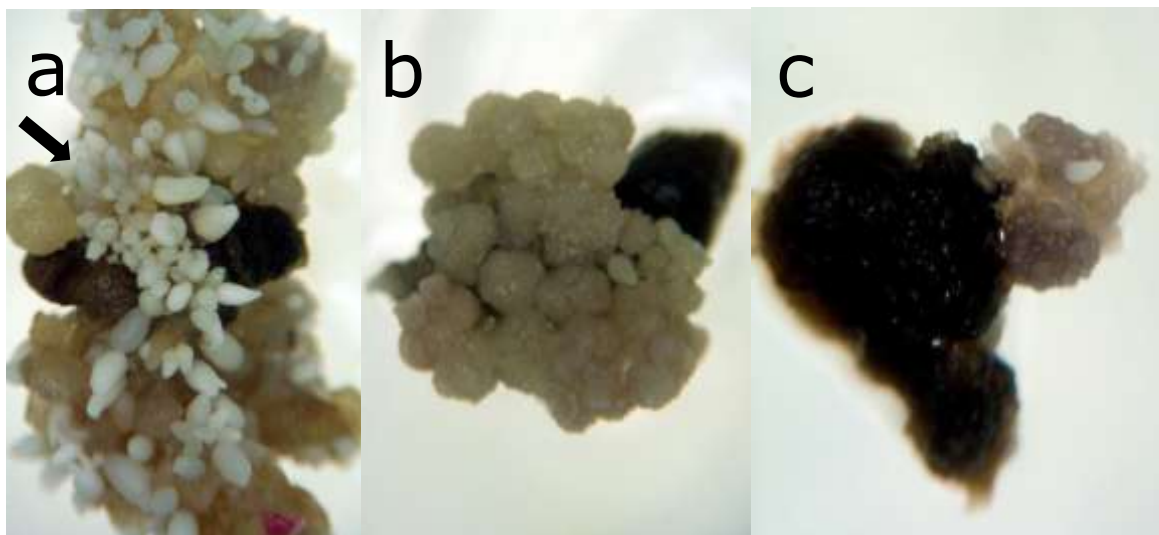


Figura 8. Principales características morfológicas de los callos obtenidos durante la inducción de embriogénesis somática en embriones cigóticos inmaduros de guayabo cv. "Enana Roja Cubana EEA-1840" con diferentes medios de cultivo y concentraciones de sacarosa. a) Callo embriogénico obtenido en medio MS y 60 g.L⁻¹ de sacarosa. Se observa la presencia de abundantes embriones somáticos (flecha) sobre la superficie del callo. b) Callo embriogénico con abundantes estructuras pro-embriogénicas obtenido en medio de cultivo WPM y 60 g.L⁻¹ de sacarosa. c) Callo embriogénico obtenido en medio de cultivo B5 y 30 g.L⁻¹ de sacarosa.

Las diferencias observadas en estas variables demuestran que la composición de las sales en el medio de cultivo afecta la formación de embriones somáticos, tal como señalaron Saha *et al.* (2011). El

medio MS es el más utilizado para la propagación *in vitro* de muchas especies de plantas, pero no siempre es el más adecuado, debido a la alta concentración de sales. El medio de cultivo WPM tiene menor concentración de sales minerales en comparación con el MS y es ampliamente empleado para el cultivo de tejidos de plantas leñosas o sensibles a la salinidad (Cardoza, 2008). En el medio MS el contenido de nitrógeno suministrado como NH_4^+ y NO_3^- es mayor que en el WPM y las fuentes de NO_3^- son diferentes, en el MS la fuente es el KNO_3 mientras que para el WPM es $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$. No obstante, la proporción $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ es similar en ambos medios de cultivo (1,90 para el MS y 1,94 para el WPM). Numerosos experimentos han demostrado claramente que la naturaleza y el equilibrio de fuentes de nitrógeno pueden inducir la embriogénesis somática y la regeneración de plantas en zanahoria silvestre (Wetherall y Dougall 1976), arroz (Ozawa *et al.* 1996), abeto blanco (Barrett *et al.* 1997), sorgo (Elkonin y Pakhomova 2000), feijoa (Dal Vesco y Guerra, 2001), algodón (Ikram-ul-Haq y Zafar 2004) y café (Samson *et al.*, 2006). Una relación $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ adecuada en el medio de cultivo ha demostrado ser un factor importante en la inducción de embriogénesis somática, ya que esta actúa indirectamente sobre los cambios de pH, influenciando la absorción de nutrientes y eventualmente la morfogénesis (Ramage y Williams, 2002). En *Feijoa sellowiana* (Myrtaceae) se encontró que con una relación $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ de 2,26 se obtuvo una alta frecuencia de inducción de embriones somáticos a partir de embriones cigóticos (Dal Vesco y Guerra, 2001), proporción muy parecida a la de los medios empleados en este experimento donde se encontró los mayores porcentajes de callo embriogénico (MS y WPM). Dussert *et al.* (1995) señalaron que el NH_4^+ juega un rol principal en la síntesis de proteínas durante la iniciación de embriogénesis somática, mientras Cárdenas-Navarro *et al.* (1999) sugirieron que el NO_3^- probablemente interviene en el mecanismo homeostático de la célula, al promover la acumulación de

agua por osmosis. Estos resultados difieren de los obtenidos por Pinto *et al.* (2008) quienes reportaron que con el empleo del medio MS a la mitad o a un cuarto de los macronutrientes se incrementó el desarrollo de callo embriogénico en *Eucalyptus globulus* Labill.

Según Rai *et al.* (2007) entre los factores determinantes que controlan la inducción de embriogénesis somática en *Psidium guajava* L. está la interacción entre el 2,4-D y la sacarosa. El efecto del 2,4-D en la inducción de embriogénesis somática de guayabo ha sido abordado en el primer experimento. La sacarosa, en la inducción de la embriogénesis somática juega un papel determinante, primeramente interviene en la regulación del potencial osmótico del medio de cultivo, ya que cuanto mayor es la concentración sacarosa en el medio de cultivo más negativo es su potencial hídrico y por ende menor será la absorción de agua por parte de los tejidos (da Silva *et al.*, 2004). Hong *et al.* (2008) reportaron que el estrés hídrico originando por altas concentraciones de sacarosa induce la acumulación de proteínas y carbohidratos en las células, lo que favorece la inducción de células embriogénicas. Esto pudiera explicar los valores superiores alcanzados en el experimento para el tratamiento medio MS y 60 g.L⁻¹ de sacarosa. Por otro lado, la sacarosa constituye la principal fuente de carbono y energía en el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales (George, 1993), incluyendo a los cultivos embriogénicos. Invertasas extracelulares catalizan la hidrólisis de la sacarosa del medio de cultivo en glucosa y fructosa (Iraqi *et al.*, 2005) y esta hidrólisis se considera el mayor estímulo para el desarrollo de la embriogénesis somática, el cual no puede ser remplazado por la adicción al medio de cultivo de los productos de la hidrólisis de la sacarosa, es decir, glucosa y fructosa (Iraqi y Tremblay, 2001).

En este experimento la concentración de 30 g.L⁻¹ de sacarosa indujo los menores valores de callo embriogénico y de formación de masas pro-embriogénicas, independientemente del medio de cultivo (figura 8 c). En este sentido, Rai *et al.* (2007) señalan que bajas concentraciones de sacarosa no dieron lugar a inducción de embriogénesis somática en embriones cigóticos de guayabo cv. "Banarasi". Los porcentajes de formación de callo embriogénico en este experimento en el medio MS y 60 g.L⁻¹ de sacarosa son similares a los reportados por Akhtar (2013b) para guayabo cv. "Allahabad Safeda" (60,7 %) y Moura *et al.* (2009) en el cv. "Paluma".

IV.2. Embriogénesis secundaria y establecimiento de suspensiones embriogénicas en guayabo

Experimento 3. *Efecto del 2,4-D y la L-glutamina en la multiplicación secundaria de embriones somáticos de guayabo.*

Hacia la segunda semana de cultivo comenzó a observarse sobre la superficie de los callos embriogénicos, estructuras globulares translúcidas semejantes a embriones (figura 9 a). Conforme trascurrió el tiempo de cultivo en los medios de proliferación ocurrió un aumento gradual de la formación de embriones somáticos en diferentes regiones de la superficie del callo, convirtiéndose en una masa heterogénea de células proembriogénicas y embriones somáticos con un mayor o menor grado de diferenciación, siendo especialmente abundantes los de etapa torpedo (figura 9 b).

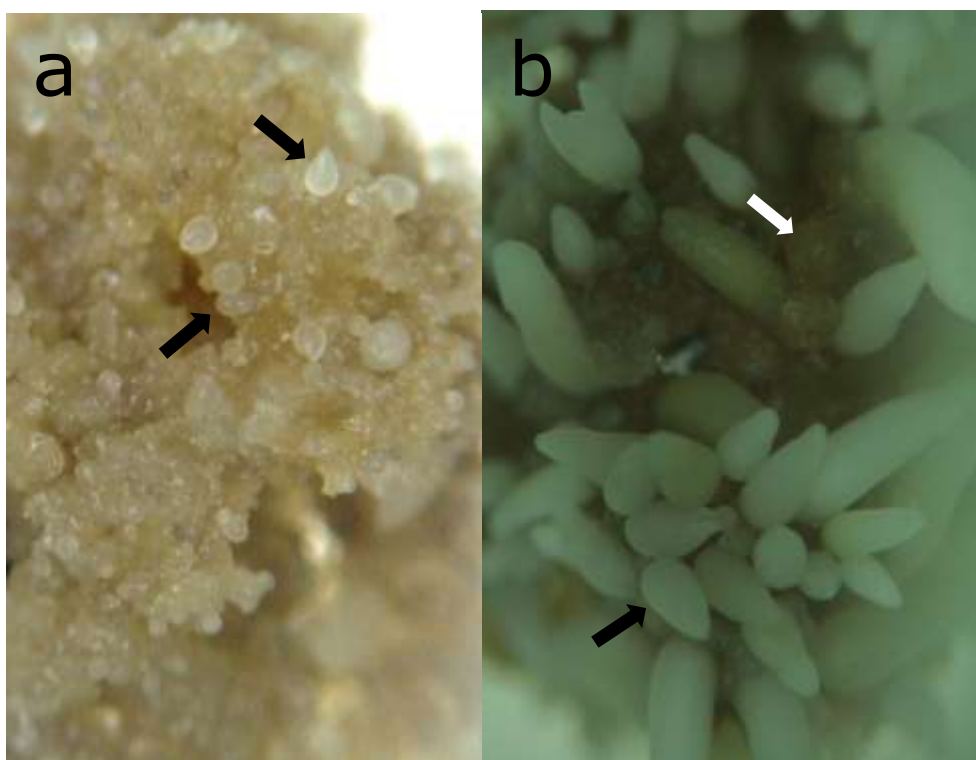


Figura 9. Principales características morfológicas de los callos obtenidos durante la fase de proliferación o de embriogénesis secundaria en guayabo cv. "Enana Roja Cubana EEA-1840". a) Callo embriogénico con abundantes estructuras embriogénicas globulares (flechas), formado hacia los 15 días de cultivo. b) Masa heterogénea de células pro-embriogénicas (flecha blanca) y embriones somáticos con un mayor o menor grado de diferenciación, con abundancia de embriones en etapa de desarrollo torpedo (flecha negra).

Después de seis semanas de cultivo en el medio de proliferación o de embriogénesis secundaria el ANADEVA detectó diferencias estadísticas ($P \leq 0,05$) para la combinación de las concentraciones de 2,4-D y L-glutamina, sobre el total de embriones formados y el número de embriones somáticos en etapa globular, torpedo y cotiledonar (tabla 3).

Tabla 3. *Efecto de la combinación de 2,4-D y L-glutamina sobre el número total de embriones somáticos, número de embriones en etapa globular, torpedo y cotiledonar, en fase de embriogénesis secundaria de guayabo cv. "Enana Roja Cubana EEA-1840".*

Concentración (mg.L ⁻¹)		Número de embriones			
2,4-D	L-glutamina	Total	Globular	Torpedo	Cotiledonar
0	200	9,4 b	4,8 ab	3,6 b	1,0 a
0	400	7,2 b	3,4 b	3,6 b	0,2 b
1	200	10,0 ab	6,6 a	3,0 b	0,5 ab
1	400	12,0 a	5,6 ab	5,4 a	1,0 a
2	200	7,2 b	2,5 bc	4,1 ab	0,6 ab
2	400	6,7 b	1,9 c	4,3 ab	0,4 ab

Los valores indicados con distintas letras difieren estadísticamente ($P \leq 0,05$) para la prueba LSD de comparación de medias. Valores reales han sido transformados por $\ln(X+1)$.

Los resultados mostraron una influencia del efecto del 2,4-D sobre la proliferación de embriones somáticos de guayaba. Los mayores valores de número total de embriones somáticos se obtuvieron con la combinación de 1 mg.L⁻¹ de 2,4-D y las concentraciones 200 y 400 mg.L⁻¹ de L-glutamina. Un comportamiento similar fue observado para el número de embriones en etapa globular. La causa más fuertemente asociada a la continua proliferación de células embriogénicas es la auxina (Gómez, 1998). Siendo la aplicación exógena de auxinas, principalmente 2,4-D, uno de los factores inductores asociados con la división celular y diferenciación de estructuras embriogénicas (von Arnold *et al.*, 2002). Los resultados muestran que sin la presencia de 2,4-D la proliferación de embriones somáticos disminuye. De acuerdo con von Arnold *et al.* (2002), cuando los cultivos embriogénicos no se transfieren regularmente a medio fresco se inicia el desarrollo paulatino de los embriones somáticos. Esto indica que en el tratamiento sin 2,4-D la síntesis de auxina en las células embriogénicas no es suficiente para inducir su proliferación.

De acuerdo con algunos autores (von Arnold *et al.*, 2002; Fehér *et al.*, 2003; Jiménez, 2005), en presencia de auxina exógena, el desarrollo de los embriones somáticos solo alcanza la etapa temprana globular-corazón. En este experimento, con la concentración de 2 mg.L⁻¹ de 2,4-D, se reconoció ese efecto inhibitor, aunque menos acentuado, pues siempre ocurrió la formación de embriones somáticos en etapas torpedo-cotiledonar. Tendencia que también fue reportada por Vilchez *et al.* (2004b) para la fase de proliferación en este mismo cultivar. En los tratamientos sin 2,4-D se estableció la embriogénesis secundaria con un número total de embriones somáticos estadísticamente similares a los tratamientos donde la concentración de 2,4-D fue de 2 mg.L⁻¹, lo que reafirma la idea del efecto inhibitorio del 2,4-D.

Con frecuencia se plantea también que largos períodos en altas concentraciones de auxina durante la fase de proliferación provocan una morfología anormal en los embriones somáticos y el desarrollo de embriones somáticos secundarios (Cruz *et al.*, 1990; Baker y Wetzstein, 1994). En este experimento, por el contrario, en los tratamientos con 1 y 2 mg.L⁻¹ de 2,4-D el callo embriogénico siguió siendo friable y nodular y tuvo lugar la formación de embriones somáticos en etapas avanzadas con una adecuada morfología (figura 8 b). Este comportamiento pudiera ser debido a que la concentración de 2,4-D estuvo alrededor de la que dio el mejor resultado en la fase de inducción (experimento 1) o a que el tiempo de cultivo en estas condiciones no se prolongó más allá de las ocho semanas.

La adición de 200 ó 400 mg.L⁻¹ de L-glutamina mejoró el efecto de la concentración de 1 mg.L⁻¹ de 2,4-D sobre la proliferación de embriones somáticos de guayabo. Freire (2003), señala que el efecto benéfico de la L-glutamina en el cultivo de callos con estructuras

embriogénicas de especies leñosas, posiblemente es debido a que este aminoácido induce una mayor utilización de amonio, mejora la utilización de nitrógeno inorgánico e impide la acumulación de iones nocivos para los tejidos. Young *et al.* (1999) señalaron que los aminoácidos son fuentes primarias de nitrógeno que estimulan el crecimiento celular y la comunicación entre las células y tejidos. Por otra parte, Durzan (1982) señaló que cuando los tejidos de las plantas toman el ion amonio, consumen trifosfato adenosina (ATP) en la conversión a aminoácidos; si los aminoácidos están disponibles en el medio de cultivo algunas moléculas de ATP puede ser conservadas. En la embriogénesis somática de *Feijoa sellowiana* (Myrtaceae) Cangahuala-Inocente *et al.* (2007b) reportaron un efecto beneficioso del ácido glutámico y la glutamina.

En los pocos trabajos de embriogénesis somática que existen en el guayabo, la información concerniente a la proliferación de los tejidos con estructuras embriogénicas es escasa o imprecisa (Chandra *et al.*, 2004). Para el cv. "Enana Roja Cubana EEA-1840" en particular, Vilchez *et al.* (2004b) reportó un procedimiento de proliferación por embriogénesis recurrente, que permitió alcanzar un máximo de 48,5 embriones somáticos secundarios por inóculo, en medio MS a la mitad de los macronutrientes, 1 mg.L^{-1} de 2,4-D y 400 mg.L^{-1} de L-glutamina. Resultados que son superiores a los obtenidos en este experimento y que probablemente estén relacionados con el tipo de explante inicial para la proliferación, mientras que en este experimento se partió de callo embriogénico, los autores mencionados utilizaron embriones somáticos en etapa globular-corazón. Al respecto, Akhtar *et al.* (2000), recomendaron para perpetuar el cultivo embriogénico en el guayabo un sistema de embriogénesis secundaria o recurrente, en el que los embriones somáticos se colocan como nuevas unidades de inóculo para comenzar un nuevo ciclo de proliferación. Además, aseguraron que el

potencial para la embriogénesis recurrente varía con las diferentes etapas de desarrollo del embrión somático.

En otras especies de angiospermas leñosas, los procesos de embriogénesis somática secundaria o recurrente estuvieron asociados a tejidos del eje embrionario (Benelli *et al.*, 2001; Zegzouti *et al.*, 2001) o con mayor frecuencia a los cotiledones del embrión primario (Canhoto y Cruz, 1996; Canhoto *et al.*, 1999; Parra y Amo-Marco, 1999). En el estudio histológico de la fase de proliferación de guayabo se observaron dos tipos de tejidos proliferantes. El primero estuvo formado por un tejido nodriza o matricial descrito por Halperin (1995), parecido al suspensor a partir del cual se originaron los embriones somáticos. Este tejido se ubicó sobre las capas superiores de los callos embriogénicos (figura 10 a). El segundo tejido proliferante se ubicó sobre un callo friable que se formó en la base de los embriones somáticos diferenciados en etapas torpedo-elongado y cotiledonar (figura 10 b). Sobre la base de algunos embriones aislados en etapa torpedo-elongado y cotiledonar fue posible observar de forma directa la diferenciación de nuevos embriones (figura 10 c). En ninguno de los tipos de tejidos proliferantes fue posible observar claramente el suspensor, posiblemente porque este estuvo inmerso dentro del tejido a partir del cual se diferenciaron los nuevos embriones. El origen unicelular de los embriones somáticos está generalmente asociado a procesos de embriogénesis somática directa, mientras que el origen multicelular se relaciona frecuentemente a una embriogénesis somática indirecta (Gómez, 1998; Quiroz-Figueroa *et al.*, 2002), lo cual concuerda con los resultados obtenidos en guayabo en la fase de proliferación.

Durante esta fase fue evidente la asincronía en la diferenciación y se observaron cinco etapas de desarrollo distintas: globular, corazón, torpedo, torpedo-elongado y cotiledonar. Siendo las más frecuente las globular y torpedo (tabla 3).

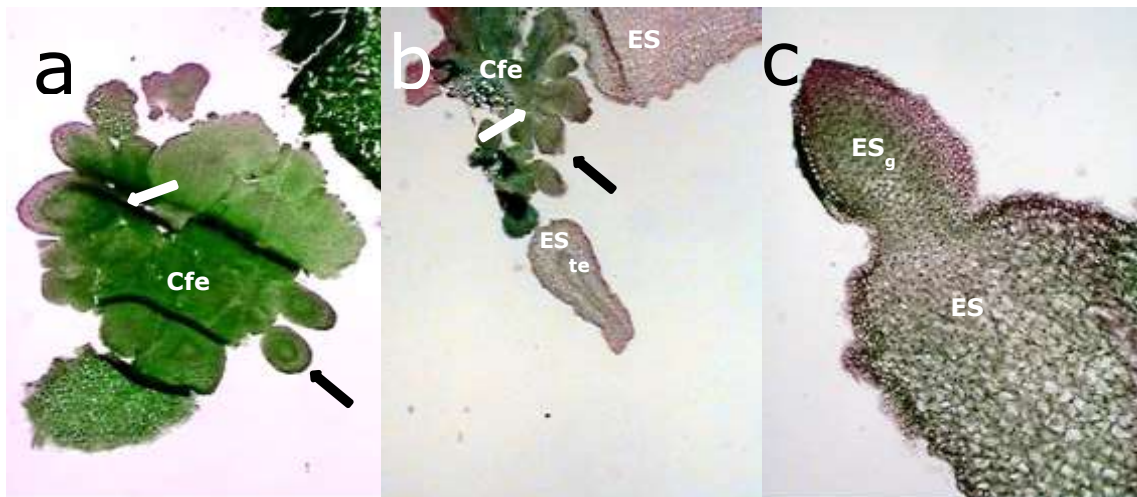


Figura 10. Histología de la fase de proliferación o embriogénesis somática recurrente en guayabo cv. "Enana Roja Cubana EEA-1840" en medio de cultivo MS suplementado con 1 mg.L^{-1} de 2,4-D, 400 mg.L^{-1} de L-glutamina, 100 mg.L^{-1} de ácido ascórbico, 60 g.L^{-1} de sacarosa y gelificado con $2,4 \text{ g.L}^{-1}$ de Phytigel®. a) Callo friable embriogénico (Cfe), con embriones somáticos en etapa globular sobre la periferia (flecha negra), las flechas blancas indican tejido nodriza del cual se originan los nuevos embriones somáticos (4X). b) Embrión somático (ES) con callo friable embriogénico en su base (Cfe), con presencia de tejido nodriza (flecha blanca) con embriones somáticos en fase globular sobre la periferia (flecha negra). Se observa un embrión somático en fase torpedo-elongado (4X). c) Embrión somático (ES) con embrión globular (ESg) diferenciándose de su base (10X).

Experimento 4. *Establecimiento de suspensiones embriogénicas a partir de callos embriogénicos de guayabo.*

Las características morfológicas de friabilidad de los callos con estructuras embriogénicas que se utilizaron para establecer las suspensiones celulares permitieron un rápido proceso de disgregación en el medio de cultivo líquido, dando lugar a suspensiones celulares embriogénicas heterogéneas. En estas suspensiones se observaron células dispersas y agregados celulares de diferentes tamaños, con o sin embriones somáticos globulares en su superficie (figura 11 c), así como algunos embriones globulares en el medio de cultivo (Figura 11 a, b).

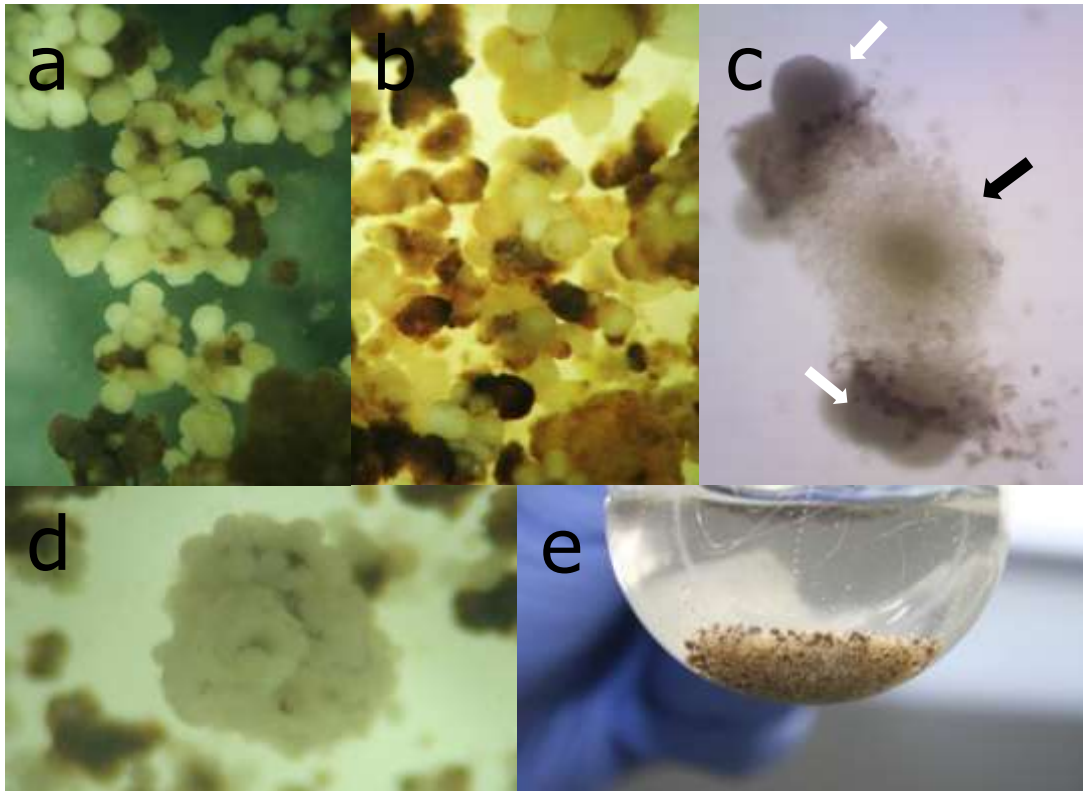


Figura 11. Establecimiento de suspensiones celulares embriogénicas de guayabo cv. "Enana Roja Cubana EEA-1840". a) Suspensión celular embriogénica heterogénea en medio de cultivo MS. b) Suspensión celular embriogénica heterogénea en medio de cultivo WPM c) Agregado celular embriogénico (flecha negra) con embriones somáticos en etapa globular sobre la superficie (flechas blancas). d) Conglomerados de embriones somáticos en etapa globular. e) Aspecto general de suspensiones celulares embriogénicas a los 56 días de cultivo en medio de cultivo MS.

Aunque los medios de cultivo evaluados se suplementaron con 100 mg.L^{-1} de ácido ascórbico, fue visible el oscurecimiento de los agregados celulares o fragmentos de callo de mayor tamaño. Este oscurecimiento también se ha observado en suspensiones celulares de *Eucalyptus cinérea* (Orozco *et al.*, 2002) y *Piper solmsianum* (Balbuena *et al.*, 2009). En este experimento los compuestos fenólicos no parecieron afectar el crecimiento de las suspensiones celulares, confirmando resultados previos de Orozco *et al.* (2002). Transcurridos 28 días se observó la formación de conglomerados de estructuras redondeadas de color blanco-opaco y superficie lisa, que se identificaron como embriones somáticos en etapa globular (figura 11 d).

La figura 12 muestra el efecto de los medios de cultivo MS y WPM sobre el VCS, en medios líquidos en agitación. Se observó un incremento en el VCS a medida que transcurrió el tiempo, típico de la fase II (Logarítmica) del patrón de crecimiento de organismos (Szabados *et al.*, 1991). Un modelo similar fue observado por Durham y Parrott (1993) en suspensiones celulares embriogénicas de maní.

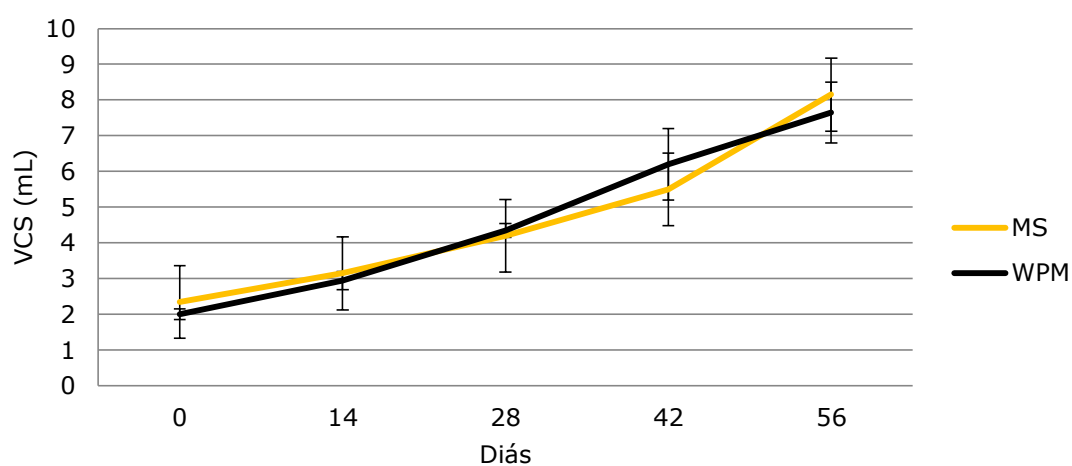


Figura 12. VCS en cultivos embriogénicos de guayabo cv. "Enana Roja Cubana EEA-1840", en medios líquidos MS y WPM en agitación.

George (1993) señala que la tasa de crecimiento de las células en suspensión se incrementa mediante la adición de caseína hidrolizada o de uno o más aminoácidos (particularmente L-glutamina) a los medios de cultivo. En nuestro caso tanto el medio MS como el WPM fueron suplementados con 400 mg.L⁻¹ de L-glutamina, lo cual pudiera explicar el comportamiento del VCS observado. Baque *et al.* (2012) reportaron que, en *Morinda citrifolia*, una concentración inicial de sacarosa alta (60 g.L⁻¹) condujo a una acumulación elevada de biomasa sin una clara fase estacionaria, de forma similar a lo observado.

Como era de esperar, se observó un consumo del medio de cultivo (figura 13) y en particular de sacarosa (figura 14) a media que transcurrió el periodo de evaluación.

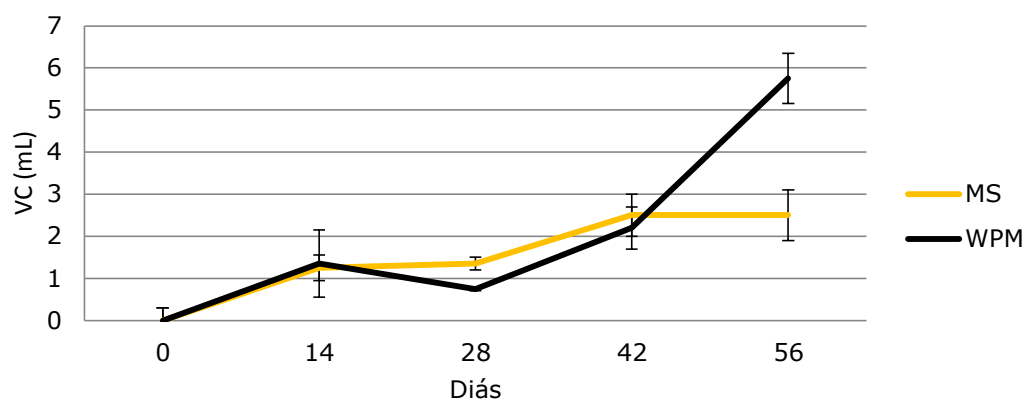


Figura 13. VC en cultivos embriogénicos de guayabo cv. "Enana Roja Cubana EEA-1840", en medios líquidos MS y WPM en agitación.

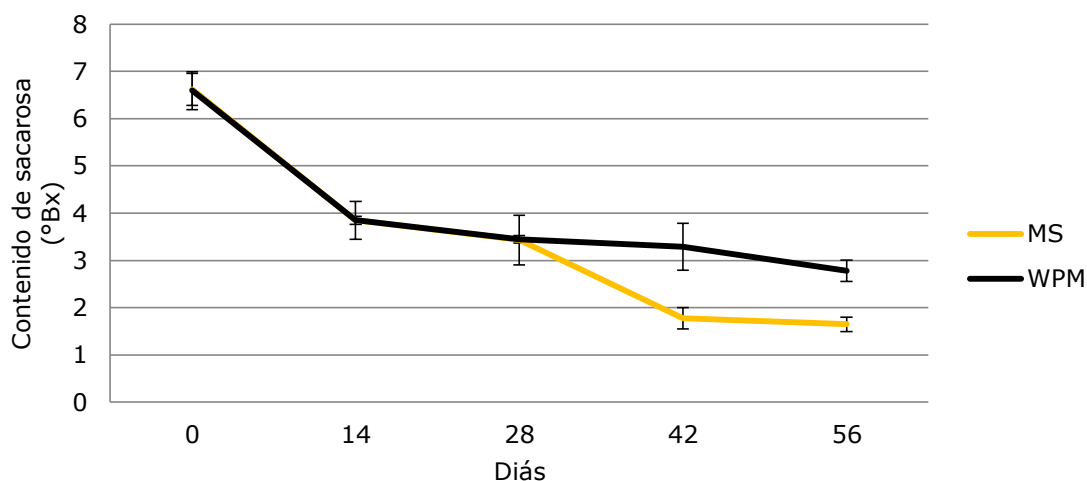


Figura 14. Contenido de sacarosa en cultivos embriogénicos de guayabo cv. "Enana Roja Cubana EEA-1840", en medios líquidos MS y WPM en agitación.

En la etapa de proliferación, los nutrientes son esenciales para asegurar un correcto metabolismo en las plantas (George *et al.*, 2008); la sacarosa, actúa como regulador osmótico en el medio de cultivo (Witjaksono y Litz, 1999b; Mauri y Manzanera, 2003), pero además, constituye la principal fuente de carbono en el proceso embriogénico (Blanc *et al.*, 1999), esta doble actividad dará la

importancia de los azúcares en la embriogénesis somática *in vitro* (von Arnold *et al.*, 2002).

En varias especies leñosas, como *Quercus ilex* L., el cultivo de los embriones somáticos en medio líquido tuvo diferentes ventajas, entre las que sobresalieron: alta frecuencia de multiplicación, rápido crecimiento de los embriones somáticos en tamaño y peso fresco, facilidad en la absorción de nutrientes, los embriones somáticos se separan mejor del callo, se reduce la labor de subcultivo y se facilita la automatización en biorreactores (Mauri y Manzanera, 2003). Estas ventajas también pudieran ser aplicables al guayabo, aunque este es el primer estudio sobre el uso del medio líquido en las fases de proliferación de embriones somáticos en esta especie.

Experimento 5. *Efecto de la densidad de cultivo estimada como VCS sobre la cinética de crecimiento de suspensiones celulares embriogénicas de guayabo.*

La figura 15 muestra la dinámica de crecimiento de suspensiones celulares embriogénicas de guayabo cv. "Enana Roja Cubana EEA-1840". El VCS se incrementó de forma progresiva, siendo esto un indicativo de que las densidades evaluadas fueron suficientes para la proliferación de células y agregados embriogénicos (Colova-Tsolova *et al.*, 2007).

La densidad de 2,5% de VCS se duplicó a los 21 días de cultivo. Posteriormente, a los 42 días, el incremento de volumen de células comenzó a decaer, correspondiendo este comportamiento con la fase de desaceleración progresiva del crecimiento celular (Szabados *et al.*, 1991). En la densidad de 5% de VCS el volumen inicial de células se duplicó entre los 21 y 28 días. Entre los 35 y 42 días se observó la fase de desaceleración progresiva y luego, el inicio de la fase de

decaimiento a partir de los 42 días. La curva de VCS con la densidad de 10%, presentó una mayor pendiente y se duplicó el volumen inicial de células en el día 28. La fase de desaceleración se inició alrededor de los 35 días y la fase estacionaria después de 42 días.

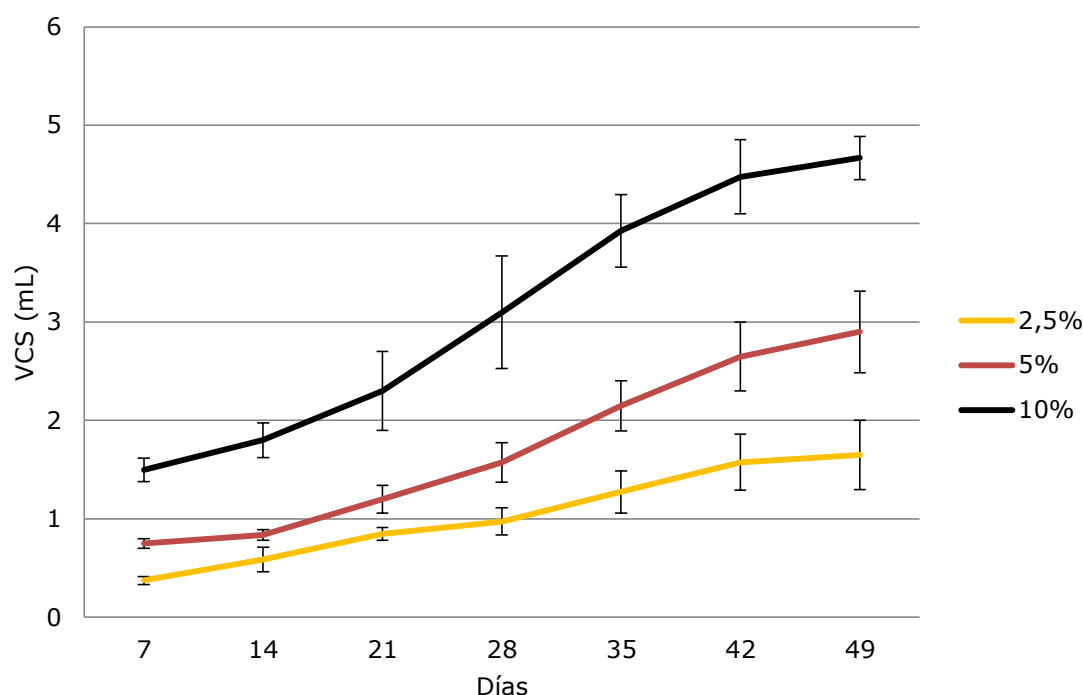


Figura 15. Efecto de la densidad de celular en la dinámica de crecimiento de suspensiones celulares embriogénicas de guayabo cv. "Enana Roja Cubana EEA-1840".

En todas las densidades evaluadas se observó que las suspensiones fueron de color crema en las primeras etapas de crecimiento (figura 16 a), pero después de 21 días de cultivo fue visible el oscurecimiento del medio y de algunos agregados celulares. Este oscurecimiento fue incrementándose con el tiempo de cultivo (figura 16 b), indicando la liberación de sustancias fenólicas, debido probablemente a muerte celular (Colova-Tsolova *et al.* 2007; De la Torre *et al.*, 2012). A partir de los 28 días, se observó la diferenciación de embriones somáticos, lo que pudiera estar asociado a la disminución de la concentración de la auxina (figura 16 c). Esto también se ha reportado en suspensiones celulares embriogénicas de otras especies leñosas como el fresno, *Fraxinus angustifolia* (Tonon *et*

al., 2001) y herbáceas como la soja (Kim *et al.*, 2004). Al final del periodo de evaluación, se observaron embriones en etapas avanzadas de desarrollo, incluyendo embriones con desarrollo del eje radicular (figura 16 d).

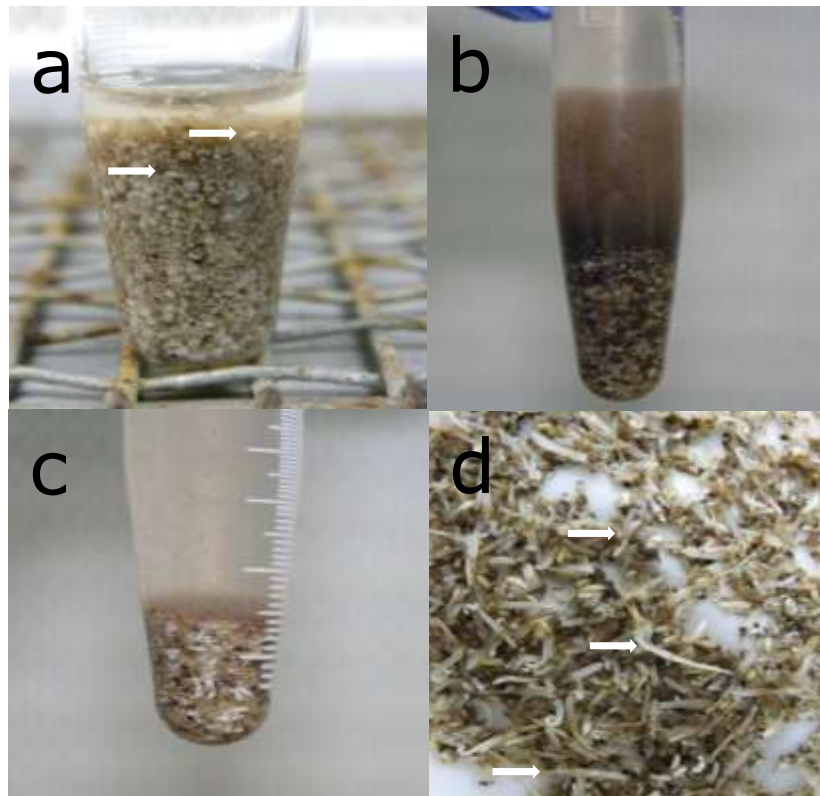


Figura 16. Características generales de suspensiones celulares embriogénicas de guayabo cv. "Enana Roja Cubana EEA-1840". a) Características generales de suspensiones celulares embriogénicas entre los 7 y 21 días de cultivo. Se aprecia la formación de estructuras embriogénicas individuales y la diferenciación de embriones somáticos (flechas blancas). b) Características generales de suspensiones celulares embriogénicas después de 21 días. Se aprecia el oscurecimiento del medio de cultivo probablemente por exudado de sustancias fenólicas. c) Suspensión celular donde se aprecia la diferenciación de embriones somáticos. d) Embriones en diferentes etapas de desarrollo al final del ensayo, las flechas blancas indican embriones somáticos con desarrollo del eje radicular.

El comportamiento observado en suspensiones celulares de guayabo es contrario al reportado por Coutos-Thévenot *et al.* (1992), para suspensiones celulares embriogénicas de vid. Estos autores señalan que la acumulación de proteínas secretadas por las células y

agregados celulares en suspensión bloquea la diferenciación de embriones.

Como era de esperarse el contenido de sacarosa en los medios fue disminuyendo a medida que las suspensiones celulares proliferaban (figura 17). En la densidad de 10% VCS, se observó un cambio de pendiente pronunciado a partir de los 21 días, mientras que en las densidades de 2,5 y 5% se observó una semana después. Esto pudiera indicar el inicio de la fase exponencial del crecimiento, donde las células y agregados celulares en multiplicación requieren mayores aportes de carbono y nutrientes para la síntesis de nueva biomasa (Baque *et al.*, 2012).

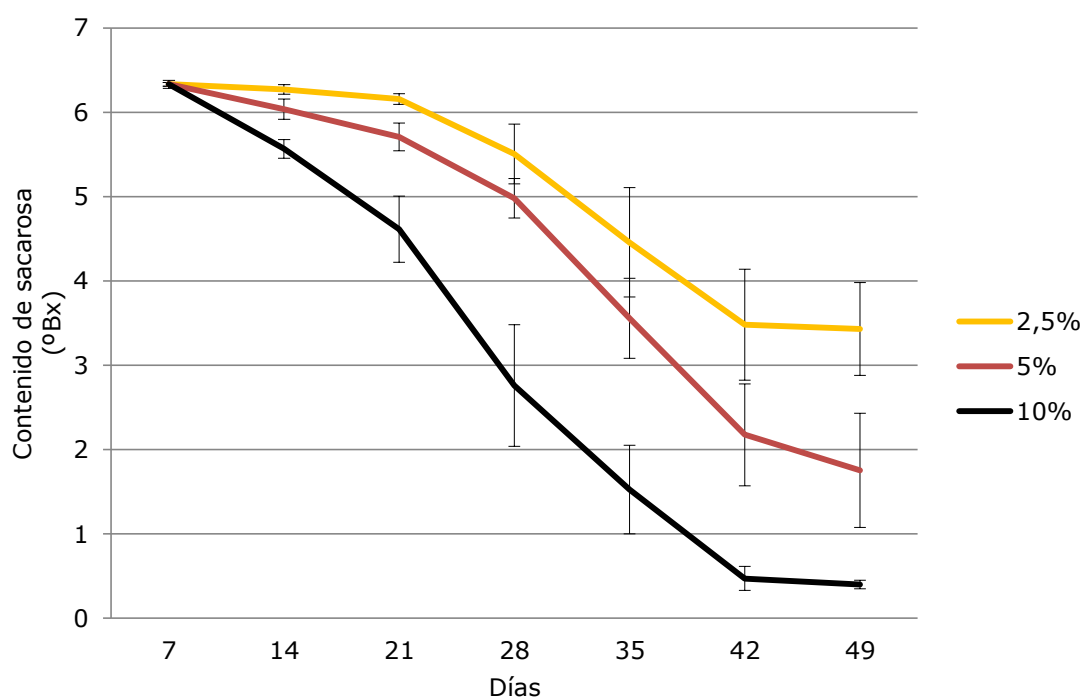


Figura 17. Contenido de sacarosa del medio de cultivo de tres densidades celulares en suspensiones celulares embriogénicas de guayabo cv. "Enana Roja Cubana EEA-1840".

En todas las densidades evaluadas, entre los 35 y 42 días se observó una ralentización en la disminución del contenido de sacarosa en el medio de cultivo, lo cual está relacionado con el inicio de la fase de

desaceleración progresiva. En esta fase, la alta proliferación de células determina que se acumulen desechos del metabolismo celular, el pH se modifique, la transferencia de energía disminuya, se obstaculicen mutuamente las células y la velocidad de división disminuya gradualmente hasta dar inicio a la fase estacionaria, que puede coincidir con el momento en que se hayan agotado los nutrientes, o al menos algunos de ellos (Barranco *et al.*, 2009). Durante esta fase, las células han alcanzado la máxima densidad permisible (Vasil y Vasil, 1982), por otro lado un menor contenido de sacarosa en el medio de cultivo probablemente pudo contribuir a reducir el factor estresante necesario para la inducción de embriogénesis (Karami y Saidi, 2010), favoreciendo la diferenciación de embriones.

La densidad de inóculo para el cultivo de células en suspensión varía para cada especie en particular, pero se ha demostrado que es uno de los parámetros de cultivo que determina el comportamiento de las suspensiones celulares (Salaj *et al.*, 2007; Barranco *et al.*, 2009). Es importante destacar que en la densidad de 2,5% no se observó una fase exponencial definida, lo que puede estar asociado al empleo de una densidad celular demasiado baja (Barranco *et al.*, 2009).

Transcurridos 49 días de cultivo, se realizó un ANADEVIA para analizar el efecto de las densidades de cultivo evaluadas sobre el peso fresco, peso seco y los porcentajes de humedad y materia seca (tabla 4). Los resultados indican que aunque con la densidad de 2,5% de VCS se obtuvo el menor valor de peso fresco y no se encontraron diferencias entre las densidades de células evaluadas en el peso seco (promedio de 8,0 mg.mL⁻¹) esta fue la de mayor eficiencia en la producción de biomasa, ya que obtuvo el mayor valor de porcentaje de materia seca y menor porcentaje de humedad.

Tabla 4. *Efecto de la densidad de cultivo estimada como VCS sobre el peso fresco, peso seco, porcentaje de humedad y de materia seca de suspensiones celulares embriogénicas de guayabo cv. "Enana Roja Cubana". Datos tomados a los 49 días de cultivo.*

Densidad de células (%)	Peso fresco (mg.mL ⁻¹)	Peso seco (mg.mL ⁻¹)	% humedad	% materia seca
2,5	24 b	7 ns	70,52 b	29,47 a
5,0	48 ab	9 ns	80,77 a	19,23 b
10,0	59 a	9 ns	84,01 a	15,98 b

Los valores indicados con distintas letras difieren estadísticamente ($P \leq 0,05$) para la prueba Tukey de comparación de medias.

Los resultados obtenidos en este experimento demuestran la posibilidad de emplear suspensiones celulares embriogénicas para la proliferación de células y agregados embriogénicos de guayabo. Sin embargo, es necesaria una investigación más profunda en aspectos como el control del oscurecimiento del medio de cultivo, que aunque no fue un parámetro evaluado tuvo una gran influencia en la viabilidad de las células y agregados en suspensión.

Sobre la base de los resultados obtenidos se puede establecer que 2,5 % de VCS es una densidad de inoculación que favorece la acumulación de biomasa así como la proliferación de células y agregados embriogénicos de guayabo cv "Enana Roja Cubana EEA-1840", bajo las condiciones aquí establecidas, debiendo realizarse los subcultivos cada 28 días para mantener el potencial embriogénico.

IV.3. Maduración y germinación de embriones somáticos de guayabo.

Experimento 6. *Efecto de la concentración del ácido abscísico sobre la maduración de embriones somáticos de guayabo.*

La tabla 5 muestra los resultados del efecto del ABA sobre la maduración de embriones somáticos de guayabo cv. "Enana Roja Cubana EEA-1840". El ANADEVA detectó diferencias significativas ($P \leq 0,05$) entre el control y las concentraciones de ABA probadas. En general, se observó una mayor producción de embriones somáticos en etapas torpedo-elongado y cotiledonar en el medio de maduración libre de ABA (tabla 5). Esta diferencia probablemente se debió a que en este experimento las dosis probadas de ABA pudieron ser excesivas, resultando inhibitorias del proceso de maduración. Vahdati *et al.* (2008) reportaron un comportamiento similar en la maduración de embriones somáticos de *Juglans regia* L., donde concentraciones de ABA por encima de 2 mg.L^{-1} redujeron la maduración y el crecimiento de los embriones somáticos. En este sentido Rai *et al.* (2008) encontraron que el porcentaje de embriones maduros de guayaba aumentó al incrementar la concentración de ABA desde $0,01$ hasta 1 mg.L^{-1} .

Tabla 5. Efecto del ABA sobre la maduración de embriones somáticos de guayabo cv. "Enana Roja Cubana EEA-1840".

Concentración de ABA (mg.L^{-1})	Número de embriones en etapa	
	Torpedo-elongado	Cotiledonar
0	27,4 a	12,1 a
1	8,1 b	1,9 b
1,5	5,5 b	1,7 b

Los valores indicados con letras distintas difieren estadísticamente ($P \leq 0,05$) para la prueba LSD de comparación de medias. Los valores reales han sido transformados por arco-seno de $((X^{-1}/4)/X)$.

En todos los tratamientos se observó la asincronía característica del cultivo, con predominio de los embriones somáticos en etapas globular-corazón, los cuales fueron imposibles de cuantificar. También se observó la diferenciación de embriones somáticos en etapas torpedo-elongado y cotiledonar de color blanco-opaco (figura 18 a), siendo este un indicativo de la acumulación de sustancias de

reserva, necesaria para la posterior germinación de los embriones somáticos (Deng y Cornu, 1992; Vahdati *et al.*, 2008), lo cual fue especialmente evidente en los medios de cultivo libres de ABA. La maduración es una fase fundamental entre el desarrollo del embrión y la germinación y, para la consecución de la máxima conversión de embriones somáticos en plántulas, es necesario proporcionar las condiciones de cultivo óptimas para la maduración de embriones somáticos (Perán-Quesada *et al.*, 2004).

Histológicamente, en las etapas torpedo-elongado y cotiledonar comenzaron a hacerse visibles por primera vez tejidos más diferenciados como la protodermis (figura 18 b) y un incipiente tejido vascular (figura 18 c). Este es un hecho sobresaliente en la embriogénesis somática del guayabo, ya que para otras especies de la familia Myrtaceae, estos tejidos se hicieron visibles en etapas de desarrollo anteriores (Canhoto y Cruz, 1996). Este hecho en el guayabo pudiera deberse a las condiciones de cultivo o simplemente a las condiciones genéticas propias de la especie. El tipo de embrión somático observado fue morfológicamente similar a los embriones somáticos que aparecen en *Hevea brasiliensis* denominados “forma de pera” (Michaux-Ferrière *et al.*, 1992), lo cual refleja que se trata de una etapa de desarrollo característica en la embriogénesis somática de especies angiospermas dicotiledóneas leñosas.

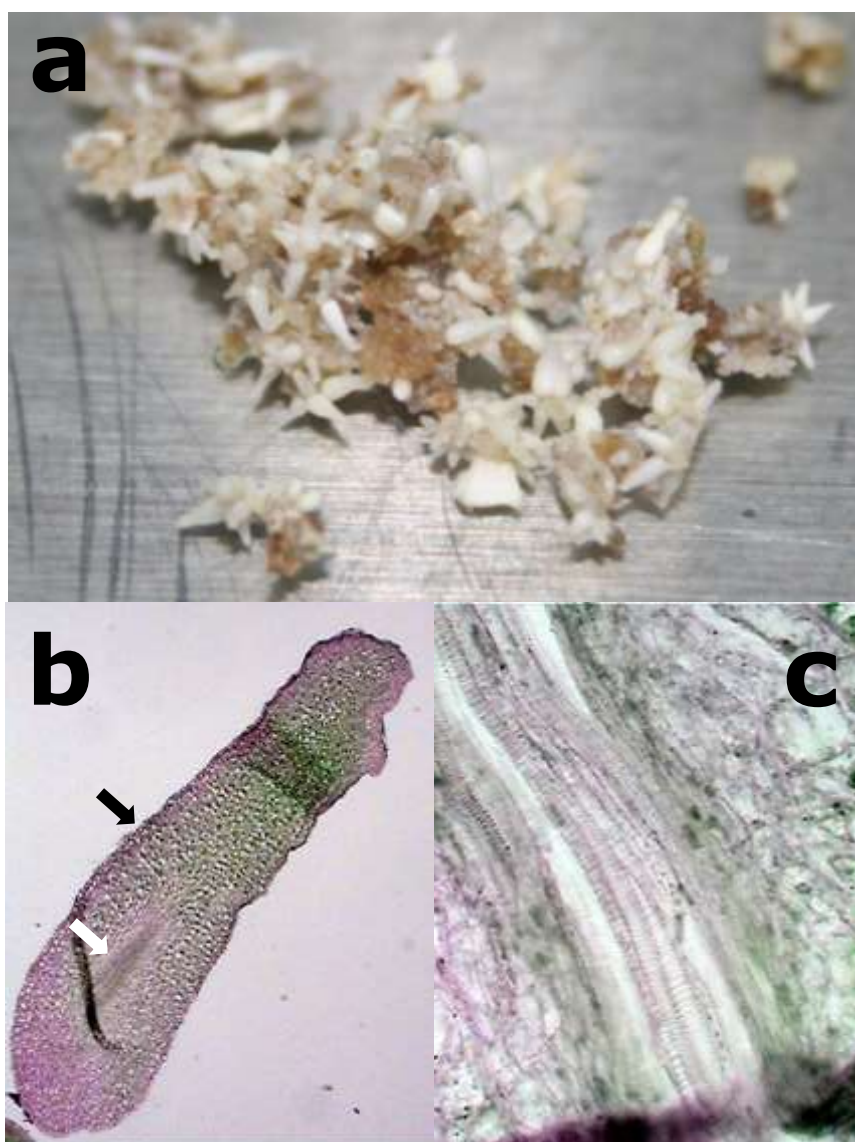


Figura 18. Maduración de embriones somáticos de guayabo cv. "Enana Roja Cubana EEA-1840". a) Aspecto general de embriones cultivados en medio de maduración MS con los macroelementos a la mitad de la concentración, 30 g.L^{-1} de sacarosa y solidificado con 4 g.L^{-1} de Agargel®. b) Embrión somático en etapa torpedo-elongado con presencia de protodermis (flecha negra) y esbozos de cambium vascular (flecha blanca) (4X). c) Tejido vascular incipiente (10X).

Experimento 7. *Efecto de la concentración de sacarosa y del medio de cultivo sobre la germinación de embriones somáticos de guayabo.*

Posteriormente al periodo de evaluación en todos los tratamientos se observó la germinación de embriones somáticos. Aproximadamente a los 12 días de cultivo se hizo morfológicamente visible la germinación

in vitro de los embriones somáticos, la cual ocurrió gradualmente y se caracterizó por un cambio de coloración en los cotiledones, desarrollo del epicótilo, así como una visible zona divisoria del crecimiento de la raíz (figura 19 a). También se observó la presencia de embriogénesis secundaria (figura 19 c) y diversos tipos de anomalías como la germinación incompleta figura (19 b), que también fueron reportadas para este cultivar por Vilchez *et al.* (2004b) y por Mhaske *et al.* (1998) en maní.



Figura 19. Aspecto general de la germinación de embriones somáticos de guayabo cv. "Enana Roja Cubana EEA-1840". a) Inicios de la germinación, nótese el cambio de color de los cotiledones (Cot) e inicio de desarrollo del epicótilo (epic). b) Germinación anormal de embrión somático. c) Presencia de embriogénesis somática secundaria en la base del embrión somático (ESg) globular, (ESst) torpedo y (ESct) cotiledonar.

El ANDEVA no encontró diferencias significativas ($P \leq 0,05$) para la combinación de concentraciones de sacarosa y del medio de cultivo, en el porcentaje de germinación (datos no mostrados). Sin embargo, al analizar cada factor por separado, se encontraron diferencias estadísticas entre los niveles ensayados (tablas 6 y 7).

Tabla 6. *Efecto de la concentración del medio de cultivo MS sobre la germinación de los embriones somáticos de guayabo cv. "Enana Roja Cubana EEA-1840".*

Concentración de macronutrientes del medio MS	Porcentaje de germinación
50%	64,16 a
100%	32,50 b

Los valores indicados con distintas letras difieren estadísticamente ($P \leq 0,001$) para la prueba de Tukey de comparación de medias. MS: medio de cultivo Murashige y Skoog, (1962). Valores han sido transformados por $(X+0,5)^{1/2}$.

Tabla 7. *Efecto de la concentración de sacarosa sobre la germinación de los embriones somáticos de guayabo cv. "Enana Roja Cubana EEA-1840".*

Porcentaje de sacarosa	Porcentaje de germinación
30 g.L ⁻¹	55,00 a
50 g.L ⁻¹	41,67 b

Los valores indicados con distintas letras difieren estadísticamente ($P \leq 0,05$) para la prueba de Tukey de comparación de medias. Valores han sido transformados por $(X+0,5)^{1/2}$.

Se observaron mayores porcentajes de germinación con las concentraciones más bajas de sacarosa y del medio de cultivo evaluadas. Esto pudiera explicarse debido a que la concentración de elementos minerales y de sacarosa son factores determinantes en la disponibilidad de agua en el medio de cultivo. El potencial de agua indica la libertad del agua ser utilizada por los sistemas biológicos, y por lo tanto determina la disponibilidad de agua del explanto (Spomer y Smith, 1996). El potencial de agua depende del potencial osmótico del medio de cultivo y decrece a medida que se incrementa la concentración solutos como los nutrientes y los agentes osmóticos como la sacarosa (da Silva *et al.*, 2004), dificultando de esta manera el libre movimiento de agua desde el medio de cultivo hasta el material vegetal. George (1993) señala que las células mantenidas en un ambiente con bajo potencial osmótico pierden agua y disminuyen

su potencial hídrico, alterando su morfogénesis. Por otro lado Shohael *et al.* (2013) señalan que las concentraciones altas de elementos nutricionales en el medio de cultivo pudieran tener un efecto adverso sobre la germinación de los embriones somáticos, posiblemente por su toxicidad; aunque este efecto está estrechamente relacionado con la absorción de elementos y depende del nivel del elemento nutricional en el tejido vegetal.

Rai *et al.* (2007 y 2008) reportaron que el porcentaje de germinación de embriones somáticos de guayabo disminuyó a medida que se incrementó la concentración de sacarosa por encima del 30 g.L⁻¹. Este comportamiento se ha señalado que es causado por la entrada en latencia de los embriones somáticos. Gray (1987) sugiere que el término "quiescencia" de embriones designa un estado de reposo que se revierte únicamente por la adición de agua, mientras que "latencia" se refiere a un estado de reposo, donde la reanudación del crecimiento depende de un tratamiento específico o condición, además de la presencia de agua. En este sentido, Choi y Jeong (2002) también reportaron que en ginseng siberiano, la germinación de los embriones somáticos fue inhibida por altas concentraciones en el medio de cultivo de sacarosa y señalan que la inducción de latencia en embriones somáticos está relacionada con la acumulación de ABA a medida que se incrementa la concentración de sacarosa, siendo esto un indicativo de inducción de la latencia de los embriones somáticos, bajo condiciones de alto estrés osmótico.

Experimento 8. *Comparación de la germinación de embriones somáticos de guayabo en sistemas de inmersión temporal y en medio semisólido.*

Después de ocho semanas de cultivo al comparar la germinación de embriones somático de guayabo cv. "Enana Roja Cubana EEA-1840"

en medio semisólido y en RITA[®], los análisis estadísticos detectaron diferencias altamente significativas ($p \leq 0,001$) para el número de embriones con desarrollo normal y radicular (tabla 8). Para ambas variables los mayores valores se obtuvieron cuando se empleó el sistema RITA[®].

Tabla 8. *Comparación de la germinación de embriones somático de guayabo cv. "Enana Roja Cubana EEA-1840" en medio semisólido y en recipiente de inmersión temporal (RITA[®]).*

Sistema de cultivo	Número de embriones con germinación:		
	Normal	Caulinar	Radicular
Control (semisólido)	30,0 b	5,0 ns	2,6 b
RITA [®]	89,6 a	3,2 ns	54,2 a

Los valores indicados con distintas letras difieren estadísticamente ($P \leq 0,001$) para la prueba de Tukey comparación de medias. ns: no significativo.

Los resultados exitosos obtenidos con el empleo de RITA[®] para número de embriones con desarrollo normal, podría explicarse parcialmente debido a que los RITA[®] son recipientes de cultivo ventilados donde se crea una atmosfera de baja humedad que promueve la maduración y germinación de los embriones somáticos (Lee *et al.*, 1997). Por otro lado, en los sistemas de inmersión temporal el contacto de los embriones con el medio de cultivo se reduce a una película delgada que cubre a los embriones, lo que podría limitar los efectos inhibitorios de compuestos excretados por los embriones somáticos (Gavish *et al.*, 1992; Quiroz-Figueroa *et al.*, 2006). En relación al elevado número de embriones con desarrollo radicular, Martre *et al.* (2001) y Berthouly y Etienne (2005) señalan que esto ocurre generalmente con el empleo de sistemas de inmersión temporal y pudiera ser un indicativo de una pobre maduración de los embriones somáticos (Tahardi *et al.*, 2003; Mallón *et al.*, 2012). Otros investigadores señalan que este comportamiento

también pudiera ser el resultado del continuo cultivo de los embriones somáticos en concentraciones relativamente elevadas de sacarosa (Mhaske *et al.*, 1998), que ocasionan una germinación precoz.

Se observó que los embriones con desarrollo normal obtenidos en los RITA[®] y en el medio de cultivo semisólido fueron morfológicamente iguales. También se observó la presencia de embriogénesis secundaria o repetitiva en ambos tratamientos y ésta fue mayor en el medio semisólido (datos no publicados), lo cual está relacionado con el suministro continuo de nutrientes en el medio de cultivo semisólido, que causa aumentos de biomasa y de la diferenciación de embriones secundarios, siendo ésto un impedimento para la sincronización de los embriones (Tahardi *et al.*, 2003). En los RITA[®], la sincronización de la regeneración de los embriones somáticos fue mejorada por la inmersión temporal, ya que durante el periodo de emersión se produce en los embriones un estrés causado por la interrupción temporal del suministro de nutrientes y en conjunción con una humedad reducida, contribuye al aumento de la producción de embriones somáticos de alta calidad, resultando esto en un sincronizado desarrollo de los embriones somáticos (Lee *et al.*, 2001), con una aparente supresión de la embriogénesis secundaria, que también ha sido reportada para *Citrus* (Cabasson *et al.*, 1997), *Hevea brasiliensis* (Etienne *et al.*, 1997) y *Camellia sinensis* (Tahardi *et al.*, 2003).

A través de la caracterización visual y por la respuesta morfogénica observada, los embriones cultivados en RITA[®], no presentaron ningún rasgo de hiperhidricidad, aspecto también señalado por Barbón *et al.* (2014) en café. Estos resultados evidencian que los RITA[®] son sistemas adecuados para mejorar la germinación de embriones somáticos, como se ha reportado en otras investigaciones

(Etienne-Barry *et al.*, 1999; Sankar-Thomas *et al.*, 2008; Tahardi *et al.*, 2003; Barbón *et al.*, 2014).

Experimento 9. *Determinación de los parámetros tiempo y frecuencia de inmersión para la germinación de embriones somáticos de guayabo en sistemas de inmersión temporal.*

Los análisis estadísticos detectaron diferencias para la combinación tiempo y frecuencia de inmersión en las variables número de embriones con desarrollo normal y radicular (tabla 9). Con la frecuencia de inmersión cada 12 h, independientemente del tiempo de inmersión evaluado (1 y 2 min), se obtuvo el mayor número de embriones con germinación normal y con desarrollo radicular.

Tabla 9. *Efecto de la combinación tiempo y frecuencia de inmersión sobre la germinación de embriones somáticos de guayabo cv. "Enana Roja Cubana EEA-1840" en recipiente de inmersión temporal (RITA®).*

Tiempo (min)	Frecuencia (h)	Número de embriones con germinación:		
		Normal	Caulinar	Radicular
1	12	114,0 a	32,3 ns	90,3 a
2	12	109,3 a	11,0 ns	52,0 b
1	8	72,0 b	23,7 ns	37,7 c
2	8	63,0 b	17,0 ns	36,7 c

Los valores indicados con distintas letras difieren estadísticamente ($P \leq 0,05$) para la prueba Tukey de comparación de medias.

Las diferencias encontradas en este experimento en las variables evaluadas pudieran explicarse debido a que con la frecuencia de inmersión cada 12 h, se proporciona una adecuada reducción de la humedad en el recipiente de cultivo, lo cual pudiera promover la desecación de los embriones somáticos y en consecuencia su maduración y posterior germinación y crecimiento. La frecuencia de

inmersión cada 8 h pudiera resultar en una excesiva humedad y con ello en una reducción en el número embriones somáticos germinados, debido a que bajo condiciones de humedades relativas cercanas al 100%, se promueve la proliferación de células indiferenciadas y la multiplicación de los embriones somáticos, mientras que en humedad relativa entre 78-90% promueven la maduración y germinación de los embriones somáticos (Lee *et al.*, 2001). Esta tendencia es confirmada al observar los valores de consumo de sacarosa y sales minerales (tabla 10), donde los análisis estadísticos detectaron diferencias ($P \leq 0,05$) para la combinación tiempo y frecuencia de inmersión, observándose un mayor consumo de sacarosa y de sales minerales con la frecuencia de inmersión cada 12 h, independientemente del tiempo de inmersión. Este consumo de sacarosa y de sales minerales pudiera estar relacionado con los procesos de diferenciación durante la germinación de los embriones somáticos. En este sentido, en la germinación de embriones somáticos de *Picea glauca* se reportó que estos consumieron el 25% de la sacarosa disponible en el medio de cultivo y que esta fuente de carbono fue utilizada por los embriones somáticos para la construcción de carbohidratos estructurales, pigmentos fotosintéticos y lípidos (Carrier *et al.*, 1997).

Por otro lado, al igual que en el experimento anterior, el número de embriones con solo desarrollo radicular parecieran ser el resultado de una germinación precoz debida a una pobre maduración de los embriones somáticos.

Tabla 10. *Efecto de la combinación del tiempo y frecuencia de inmersión sobre el consumo de sacarosa, sales minerales y pH en la germinación de embriones somáticos de guayabo cv. "Enana Roja Cubana EEA-1840" en recipiente de inmersión temporal (RITA®).*

Tiempo (min)	Frecuencia (h)	pH	Consumo de sacarosa (°Bx)	Consumo de sales minerales ($\mu\text{S} \cdot \text{m}^{-1}$)
1	12	4,4 b	1,8 a	2242,3 a
2	12	5,0 a	2,0 a	2534,0 a
1	8	4,6 b	1,6 c	2002,0 b
2	8	4,6 b	1,7 ab	2007,0 b

Los valores indicados con distintas letras difieren estadísticamente ($P \leq 0,05$) para la prueba Tukey de comparación de medias.

Experimento 10. *Efecto de la densidad de inóculo inicial de embriones somáticos sobre la germinación en sistemas de inmersión temporal.*

A las cinco semanas de cultivo se observó la presencia de embriones somáticos germinados en los dos tratamientos evaluados. El mayor número de embriones con desarrollo normal y caulinar se obtuvo con la densidad de 500 mg de masa fresca inoculada. En esta densidad no se observaron embriones con desarrollo radicular (tabla 11).

Tabla 11. *Efecto de la densidad de inóculo inicial de embriones somáticos de guayabo cv. "Enana Roja Cubana EEA-1840", sobre la germinación, en recipiente de inmersión temporal (RITA®).*

Densidad de inóculo	Número de embriones germinados		
	Normal	Caulinar	Radicular
250 mg	67,3 b	28,3 b	2,0 a
500 mg	103,3 a	87,3 a	0,0 b

Los valores indicados con distintas letras difieren estadísticamente ($P \leq 0,05$) para la prueba de Tukey comparación de medias.

Tabla 12. *Efecto de la densidad de inóculo inicial de embriones somáticos sobre el consumo de sacarosa, sales minerales y pH del medio de cultivo, en la germinación de embriones somáticos de guayabo cv. "Enana Roja Cubana EEA-1840" en recipiente de inmersión temporal (RITA®).*

Densidad de inóculo	pH	Consumo de sacarosa (°Bx)	Consumo de sales minerales ($\mu\text{S.m}^{-1}$)
250 mg	4,5 ns	0,16 b	1057,8 b
500 mg	4,4 ns	0,75 a	1905,3 a

Los valores indicados con distintas letras difieren estadísticamente ($P \leq 0,05$) para la prueba de Tukey comparación de medias.

Los resultados revelaron que se estableció una relación directamente proporcional entre la densidad de inóculo y el número embriones normales y con desarrollo caulinar. La mayor germinación observada en la densidad de 500 mg, pudiera estar relacionado con una mayor consumo de nutrientes y sacarosa como se observa en el tabla 12, lo que pudo desencadenar procesos de expansión celular, acumulación de sustancias de reserva y posterior diferenciación de los embriones en etapas avanzadas de desarrollo (González *et al.*, 2014). En este sentido, García-Águila *et al.* (2010) señalan que la selección adecuada de la densidad de inoculación debe determinarse por su efecto sobre la reducción de la asincronía durante el desarrollo del proceso de embriogénesis somática. Por otro lado la densidad de inóculo determina la cantidad de volumen de medio de cultivo disponible por explante, además del espacio físico para su desarrollo. Barbón *et al.* (2014), señalan que bajas densidades de inoculo, donde hay un mayor volumen de medio de cultivo por embrión, promueven condiciones estresantes para la germinación de los embriones. La tendencia observada en este experimento es similar a la reportada en otros cultivos como café (Barbón *et al.*, 2014) y plátano (García-Águila *et al.*, 2010).

Las ventajas de los sistemas de inmersión temporal parecen ser el resultado de las condiciones físicas creadas en el recipiente de cultivo como son: mayor disponibilidad de nutrientes y mejor difusión de los metabolitos excretados por los tejidos; además, debido a la ausencia de gelificante, se pueden medir de forma continua, variaciones en el pH, conductividad, iones, etc., al tiempo que se puede reemplazar el medio con más facilidad (Etienne y Berthouly, 2002; Celestino *et al.*, 2005). Además se ha comprobado que las condiciones de ayuno-nutrición y la baja humedad relativa, impuestas durante la fase de emersión en los sistemas de inmersión temporal, tienen efectos de regulación morfogénica particularmente mejorando la germinación de los embriones somáticos (Tahardi *et al.*, 2003).

Experimento 11. *Comparación de la germinación de embriones de guayabo en sistemas de inmersión temporal y en envase de cultivo con ventilación forzada.*

La tabla 13, muestra los resultados de la germinación de embriones de guayabo cv. "Enana Roja Cubana EEA-1840" en RITA[®], ECCVF y ECSVF. El ANADEVA detectó diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0,05$) entre los diferentes sistemas de ventilación forzada probados. Para el número de embriones somáticos con germinación normal, los mayores valores se obtuvieron en los RITA[®] y en los ECCVF (103,3 y 98,9, respectivamente), sin diferencias significativas entre ellos.

Las características intrínsecas de los envases de ventilación forzada pudieran explicar los resultados obtenidos, en los RITA[®] y en los ECCVF. Esto es, la renovación periódica de la atmósfera proporciona una reducción de la humedad en el recipiente equilibrándola con la humedad relativa de la cámara de cultivo, lo cual pudiera promover la desecación de los embriones somáticos y de esta manera su

maduración y posterior germinación (Lee *et al.*, 2001). Por el contrario, en el tratamiento control (ECSVF) se produce una excesiva humedad, que favorece la proliferación de embriones somáticos y disminuye su capacidad de germinación (Lee *et al.*, 2001). Estos resultados siguen la misma tendencia de los reportados por Afreen *et al.* (2002) en *Coffea arabusta*, quienes evaluaron RITA[®] modificados para mejorar el intercambio gaseoso y encontraron que con este tipo de sistema, mejoró la conversión de embriones somáticos en estado cotiledonar en plántulas.

Tabla 13. Germinación de embriones somáticos de guayabo cv. "Enana Roja Cubana EEA-1840" en recipientes de inmersión temporal automatizados (RITA[®]), envases de cultivo con ventilación forzada (ECCVF) y envases de cultivo sin ventilación forzada (ECSVF).

Sistema de cultivo	Número de embriones germinados:		
	Normal	Caulinar	Radical
ECSVF	30,0 b	11,80 b	2,60 a
RITA [®]	103,3 a	10,33 a	2,00 a
ECCVF	98,8 a	5,20 b	0,00 b

Los valores indicados con distintas letras en cada columna difieren estadísticamente ($P \leq 0,05$), para la prueba de Tukey comparación de medias.

Aunque el número de embriones con germinación normal no fue estadísticamente diferente entre ECCVF y RITA[®], en los últimos fue superior, lo cual pudiera ser debido a que en los ECCVF la difusión de los nutrientes entre el medio de cultivo y los embriones es baja, mientras que en los RITA[®] los nutrientes pueden ser absorbidos más rápidamente ya que el contacto intermitente del medio de cultivo, con la mayor parte o la superficie completa de los embriones somáticos, mejora la difusión de nutrientes entre los explantes y el medio de cultivo (Watt, 2012); además, estas condiciones podrían limitar los efectos adversos de los compuestos excretados por los embriones somáticos (Gavish *et al.*, 1992; Quiroz-Figueroa *et al.*, 2006).

Por otra parte, el menor número de embriones somáticos con germinación normal en ECSVF, pudiera estar relacionado con una distribución poco uniforme de la concentración de CO₂ y de la humedad relativa en el recipiente de cultivo. En este sentido Afreen *et al.* (2002) reportó que en recipientes de cultivo sin ventilación forzada los niveles de CO₂ disminuyen linealmente con el aumento de la distancia desde la base hacia la tapa. Además, la ventilación forzada promueve el crecimiento de explantes, ya que ésta reduce la resistencia a la difusión del CO₂ entre la superficie de la hoja y el ambiente del vaso de cultivo (Heo *et al.*, 1999); probablemente porque con cada renovación atmosférica se reduce la humedad en el recipiente de cultivo.

Con el empleo de ECCVF se redujo el número de embriones con desarrollo anormal (caulinar y radicular). La presencia de embriones anormales se ha reportado en la embriogénesis somática de varios cultivos como maní (Chengalrayan *et al.*, 1994 y 1997), eucalipto (Pinto *et al.*, 2002), plátano (García-Águila *et al.*, 2010) y café (Barbón *et al.*, 2014) entre otros; y también se ha asociado a los sistemas de inmersión temporal (Berthouly y Etienne, 2005), sin embargo en los ECCVF el bajo número de embriones anormales pudiera estar relacionado con una mayor acumulación de proteínas de reservas, debido a una menor humedad en el recipiente de cultivo (Lee *et al.*, 1997).

IV.4. Conversión en plantas de los embriones somáticos de guayabo

Experimento 12. *Comparación del crecimiento en vivero de vitroplantas provenientes de embriogénesis somática y de plantas semilla.*

En la comparación del crecimiento entre plántulas de semilla y vitroplantas, la figura 20 muestra las tendencias ajustadas de la acumulación de peso seco, observándose que para ambos tipos de plantas la acumulación de peso seco en el tiempo concordó con un modelo polinomial de tercer grado ($R^2=0,99$), típico de las fase I (Estacionaria) y II (Logarítmica) del patrón de crecimiento de los organismos (Steward, 1969).

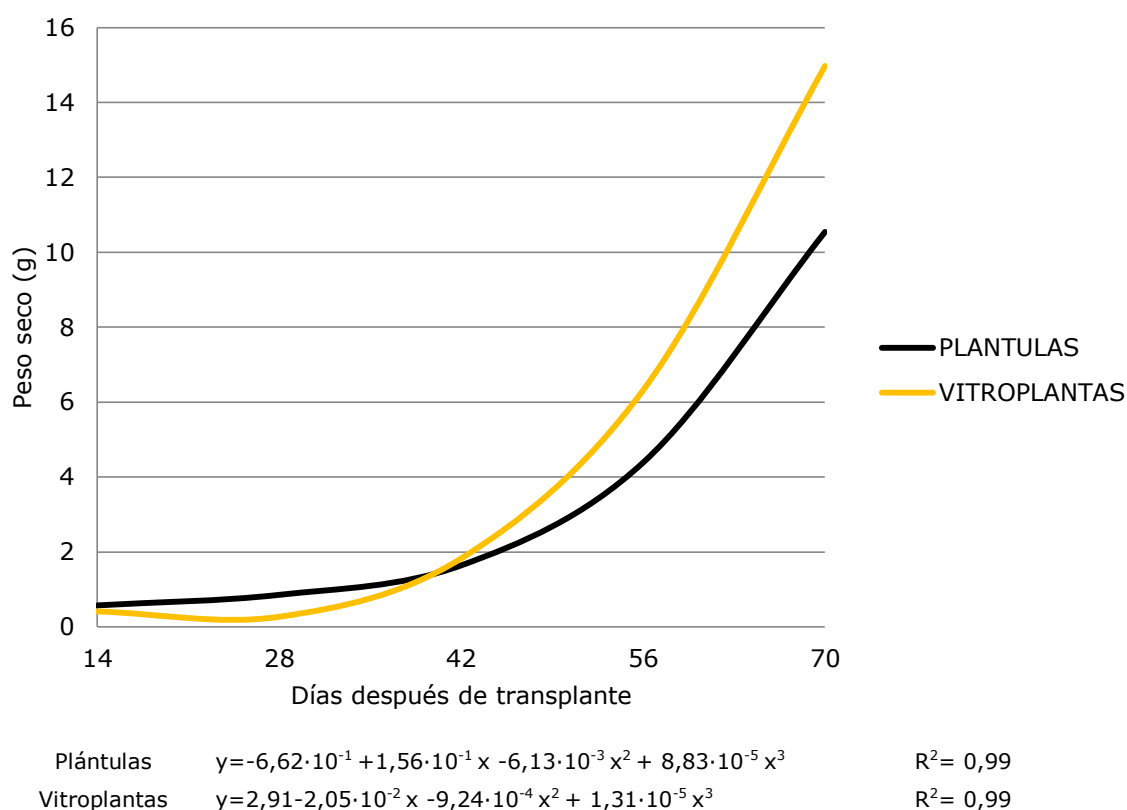
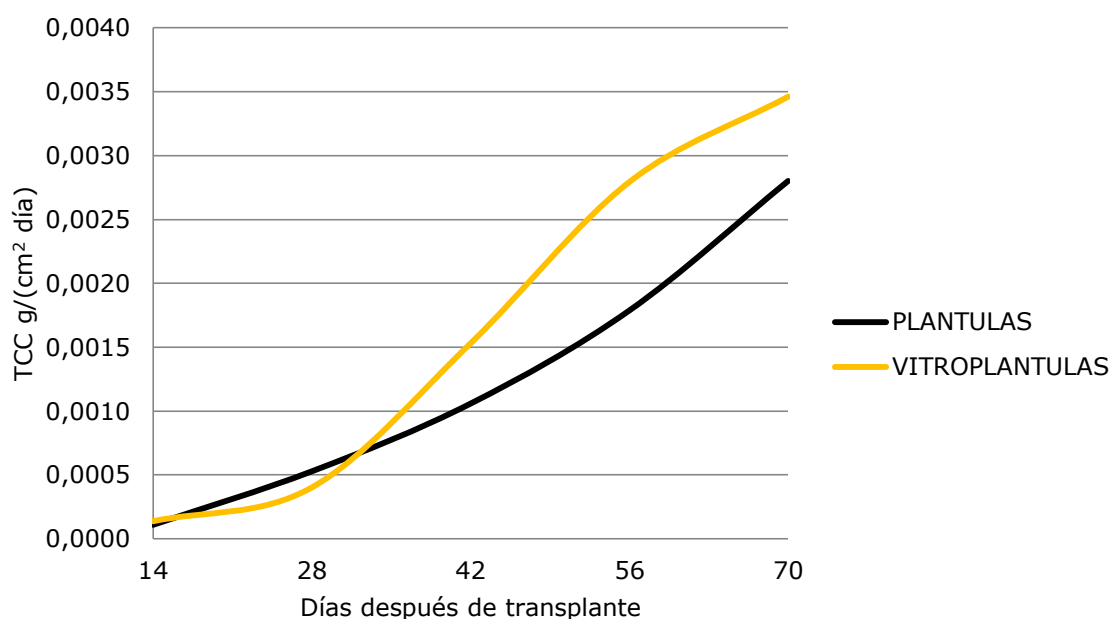


Figura 20. Tendencias ajustadas de la acumulación de peso seco en plántulas y vitroplantas micropropagadas de guayabo cv. "Enana Roja Cubana EEA-1840".

Se observa que antes de los 42 ddt la acumulación de peso seco inicial fue ligeramente inferior para las vitroplantas en comparación con las plántulas, pero posteriormente las vitroplantas alcanzan mayores valores de acumulación de peso seco, lo cual pudiera estar relacionado con una fase de aclimatación ligeramente más prologada en las vitroplantas en comparación con las plántulas. Las características fisiológicas intrínsecas de las plántulas provenientes de

procesos de regeneración *in vitro*, como lo son mal funcionamiento de los estomas, menor contenido de reservas, pobre desarrollo de la cera epicuticular, brotes alargados y baja concentración de clorofila, determinan tasas de la actividad fotosintética muy reducidas (Rogalski *et al.* 2003), lo que se traduce en bajas tasas de crecimiento y en un bajo porcentaje de supervivencia *ex vitro* (Kozai y Kubota, 2005). Por otro lado está demostrado que, en muchas especies, las hojas formadas *in vitro* son incapaces de seguirse desarrollando en condiciones *ex vitro* y son reemplazadas por hojas recién formadas (Tadeo y Gómez, 2008).

La figura 21 muestra tendencias ajustadas a modelos polinomiales de tercer grado ($R^2=0,97$ para plántulas y $R^2=0,99$ para vitroplantas) de la TCC en plántulas de semilla y vitroplantas micropropagadas de guayabo cv. "Enana Roja Cubana EEA-1840", donde los mayores valores acumulación de peso seco por unidad de superficie por día lo lograron las vitroplantas. Para ambos tipos de plantas se observó que en general hasta 28 ddt, la TCC fue baja, probablemente debido a que existen pocas hojas fotosintéticamente activas entre los 0 a 28 ddt.



Plántulas	$y = -2,84 \cdot 10^{-4} + 2,93 \cdot 10^{-5} x - 1,59 \cdot 10^{-7} x^2 + 5,28 \cdot 10^{-9} x^3$	$R^2 = 0,97$
Vitroplantas	$y = 1,46 \cdot 10^{-3} - 1,69 \cdot 10^{-4} x + 5,92 \cdot 10^{-6} x^2 - 4,43 \cdot 10^{-8} x^3$	$R^2 = 0,99$

Figura 21. Tendencias ajustadas de la tasa de crecimiento del cultivo (TCC) en plántulas y vitroplantas micropropagadas de guayabo cv. "Enana Roja Cubana EEA-1840".

Transcurridos de 28 ddt, se incrementaron los valores de TCC, producto del aumento en el número de hojas y del área foliar (datos no mostrados); lo cual se mostró en la curva de TCC como un aumento exponencial del crecimiento, que fue superior en las vitroplantas. Según Rodríguez *et al.* (2003), el potencial genético de las plantas y las condiciones ambientales afectan a la velocidad del crecimiento vegetal. Los valores superiores de TCC encontrados en las vitroplantas pueden ser debidos a que las vitroplantas tienen una muy limitada reserva, lo que implica que para asegurar la supervivencia, el paso de organismo mixotrófico a autotrófico debe completarse antes de agotarse las reservas. Por otro lado, se ha señalado que el desarrollo y rendimiento de las vitroplantas son superiores a las planta propagadas por métodos convencionales (Pérez, 1998). A medida que surgieron nuevas hojas (figura 22), con

mejores características, el incremento de esta variable se fue haciendo más notable. En este sentido Peñate *et al.* (2007) señalan que la aparición de nuevas emisiones foliares en la fase de aclimatación garantiza un mayor grado de autotrofía que permite un incremento paulatino de la actividad fotosintética, pues estas hojas presentan un aparato estomático más desarrollado.



Figura 22. Vista general del crecimiento de vitroplantas micropropagadas de guayabo cv. "Enana Roja Cubana EEA-1840". Al inicio (a) y al final (b) de la fase de vivero.

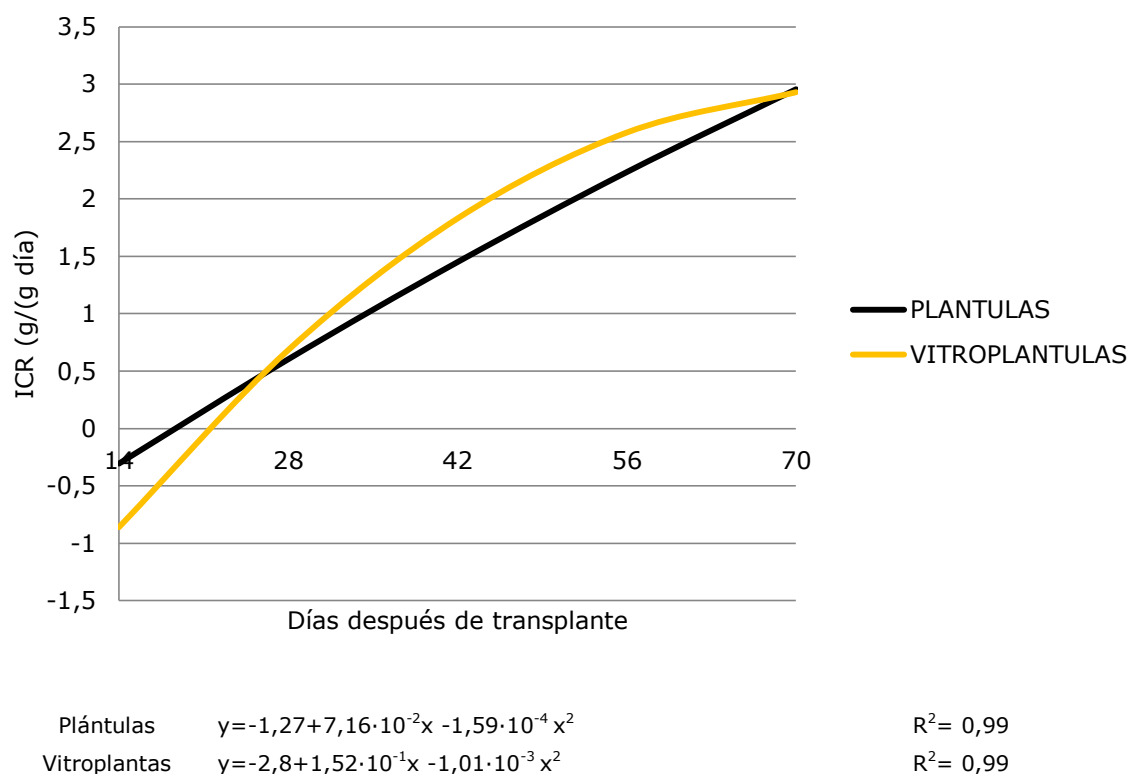


Figura 23. Tendencias ajustadas del índice de crecimiento relativo (ICR) en plántulas y vitroplántulas micropropagación de guayabo cv. "Enana Roja Cubana EEA-1840".

La figura 23, muestra las tendencias ajustadas a modelos polinomiales de segundo grado ($R^2=0,99$) del índice de crecimiento relativo (ICR) en plántulas de semilla y vitroplántulas de guayabo cv. "Enana Roja Cubana EEA-1840". Se observaron valores de ICR negativos en los primeros estadios de crecimiento en vivero para ambos tipos de plántulas. Estos valores se asocian al trasplante a la bolsa de cultivo, ya que durante el trasplante se producen variaciones en el contenido hídrico de las plantas y marchitez de las hojas, incluso un estrés hídrico suave que ocasiona una reducción del crecimiento, siendo especialmente sensible la expansión celular (Ribas *et al.*, 2008). Por otro lado, en los primeros días de la etapa de crecimiento en vivero las plantas dependen de sus reservas, debido al incremento de la actividad respiratoria, asociado a la transformación de almidones en azúcares para crecimiento. Esto ocasiona una disminución del peso seco; además, está demostrado que en las

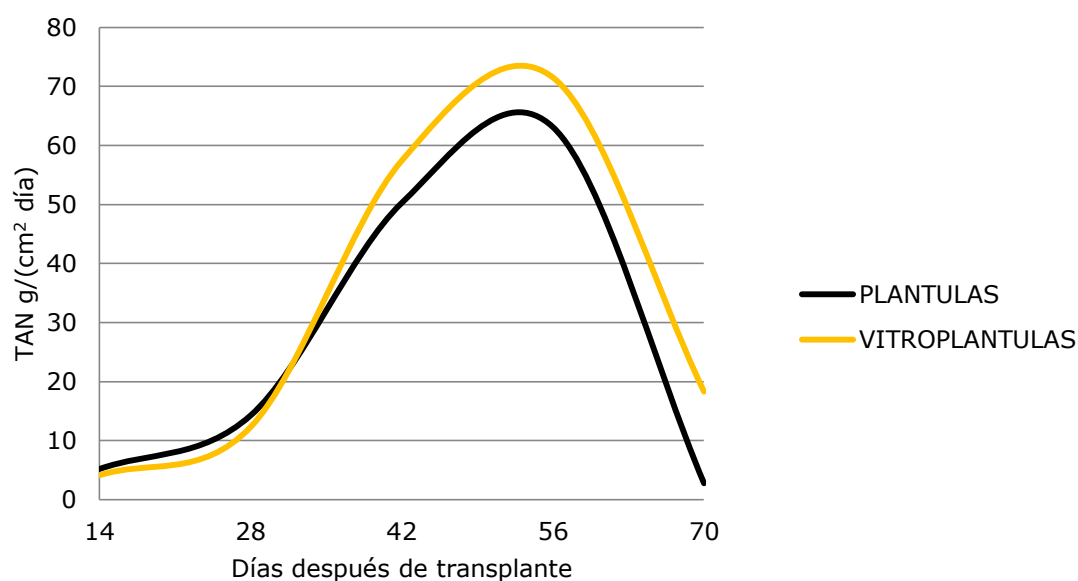
plantas cuya tasa de crecimiento es cero, toda la respiración estará destinada a procesos de mantenimiento (Tadeo y Gómez, 2008), por lo que la cantidad de reservas es un factor a considerar en los primeros inicios del crecimiento. En esta línea, mientras las plántulas presentan cotiledones como órganos de reservas, en las vitroplantas obtenidas de procesos de regeneración vía embriogénesis somática, la acumulación del almidón y proteínas de reserva se da en la fase de maduración (Perán-Quesada *et al.*, 2004; Gómez, 1998); siendo esta fase fundamental entre el desarrollo del embrión y la germinación, para la consecución de la máxima conversión de embriones somáticos a plántulas (Perán-Quesada *et al.*, 2004). Además, como se observó en la curva de acumulación de peso seco y TCC (figura 20 y 21, respectivamente), es a partir de los 28 ddt cuando comienza la actividad fotosintética de las hojas.

Transcurridos de los 28 ddt se observó que para las vitroplantas la pendiente de la curva de tendencia de acumulación nuevo peso seco en función de peso seco acumulado, fue sensiblemente mayor que para el caso de las plántulas de semilla, ya que estas acumularon menos peso seco (figura 20) y por lo tanto fueron menos eficientes en su crecimiento. Esto pudiera estar relacionado con un aparato fotosintético menos desarrollado y por ende menos eficiente, debido a un menor número de hojas y menor área foliar (tabla 14). Esto supone una ventaja fisiológica a favor de la vitroplantas ya que se consigue un mayor tamaño (biomasa) en menos tiempo, que le permite a su vez captar más recursos (luz, agua y nutrientes) y en definitiva le confiere una mayor capacidad competitiva.

Tabla 14. Comparación del crecimiento en vivero entre plántulas y vitroplantas de guayabo cv. "Enana Roja Cubana EEA-1840" provenientes de la micropropagación y de semilla.

Material Vegetal	Número de hojas	Área foliar (cm ²)	Longitud del tallo (cm)	Longitud de raíz (cm)
Plántulas	23,2 b	383,4 b	30,2 a	25,8 a
Vitroplantas	27,8 a	493,4 a	26,9 b	24,1 a

Los valores indicados con distintas letras difieren estadísticamente ($P \leq 0,05$) para la prueba Tukey de comparación de medias.



Plántulas	$y = 73,1 - 8,79x + 3,24 \cdot 10^{-1}x^2 - 3,04 \cdot 10^{-3}x^3$
Vitroplantas	$y = 53,4 - 6,9x + 2,79 \cdot 10^{-1}x^2 - 2,68 \cdot 10^{-3}x^3$

$$R^2 = 0,95$$

$$R^2 = 0,95$$

Figura 24. Tendencias ajustadas de la tasa de asimilación neta (TAN) en plántulas y vitroplantas micropropagadas de guayabo cv. Enana "Roja Cubana EEA-1840".

La figura 24 muestra las tendencias ajustadas a modelos polinomiales de tercer grado ($R^2=0,95$) de la tasa de asimilación neta (TAN) en plántulas de semilla y vitroplantas de guayabo cv. "Enana Roja Cubana EEA-1840". Se observaron valores bajos para la TAN en el intervalo de 14 a 28 ddt, lo que indica que durante este tiempo no hubo incremento en la biomasa de las plántulas, como se puede apreciar en los valores de peso seco mostrados en la figura 20.

Probablemente este hecho pudiera ser debido a que todo el CO₂ fijado en la fotosíntesis es consumido en la respiración o a que las plántulas bajo estas condiciones sobreviven a expensas de las sustancias de reserva, lo que puede ser el resultado de un comportamiento de fotoautotrofia incompleta o a una supresión de la fotosíntesis durante este período (Kozai *et al.*, 1991; Arigita *et al.*, 2002; Abreu *et al.*, 2007). Después de los 28 ddt se observa un crecimiento exponencial en la TAN, con valores superiores para las vitroplantas, lo cual está relacionado con una mayor actividad fotosintética debido a un mayor número de hojas y área foliar (tabla 14). También se observa una inflexión en la curva alrededor de los 56 ddt donde comienzan a disminuir los valores de la TAN, que pudiera estar relacionado con una disminución de la asimilación debido a que el volumen del contenedor comienza ser restrictivo para el desarrollo de las raíces, limitando la absorción de agua y nutrientes; para el día 70 ddt la longitud de la raíces de las vitroplantas fue de 48,5 cm, mientras que en las plántulas fue alrededor de un 30% mayor (62,32 cm).

V. CONCLUSIONES

Una vez concluidos los experimentos se ha llegado a las siguientes conclusiones:

- I. En embriones cigóticos inmaduros de guayabo se indujo la embriogénesis somática indirecta empleando el medio de cultivo MS, suplementado con 1 m.L⁻¹ de 2,4-D, 400 mg.L⁻¹ de L-glutamina, 100 mg.L⁻¹ de ácido ascórbico, 2,4 g.L⁻¹ de Phytigel® y 60 g.L⁻¹ de sacarosa. En este mismo medio de cultivo se logró la proliferación de los embriones somáticos.
- II. Se logró establecer suspensiones celulares embriogénicas de guayabo en los medios de cultivo WPM y MS, obteniéndose con este último mayores valores de volumen de células sedimentadas.
- III. El estudio de las densidades de inóculo de las suspensiones celulares embriogénicas de guayabo, permitió establecer que la densidad de inoculación de 2,5 % de VCS favoreció una mayor acumulación de biomasa así como la proliferación de células y agregados embriogénicos.
- IV. Los embriones somáticos maduraron sin el empleo de ABA y las tasas de germinación en medio semisólido fueron superiores al emplear el medio MS al 50% de la concentración de sus macroelementos y 30 g.L⁻¹ de sacarosa.
- V. Se determinó que la germinación de embriones somáticos en sistema de inmersión temporal fue superior en comparación con el medio semisólido y que los parámetros de frecuencia y tiempo de inmersión adecuados para la germinación de embriones somáticos fueron cada 12 h y 1 ó 2 min, respectivamente. La densidad del

inoculo tuvo efecto sobre la germinación de embriones somáticos de guayabo y con 500 mg de peso fresco se obtiene el mayor valor de germinación de embriones somáticos.

- VI. La germinación de los embriones somáticos en sistemas de ventilación forzada mejoró la calidad de los embriones y con ello su germinación en comparación con los sistemas sin ventilación forzada (medio semisólido).
- VII. Las plántulas mostraron mayor acumulación de peso seco y crecimiento durante los primeros 28 después del trasplante. Después de este periodo y una vez que las vitroplantas desarrollaron la condición de fotoautotrofismo, estas fueron superiores a las plántulas, en las variables de crecimiento evaluadas a excepción de la longitud del tallo.
- VIII. El estudio histológico reveló que la embriogénesis somática en el guayabo es indirecta y de baja frecuencia, observándose una etapa intermedia de callo previo a la formación de estructuras embriogénicas diferenciadas a partir de los tejidos epidérmicos y sub-epidérmicos del embrión cigótico inmaduro. En la fase de proliferación de guayabo, se observaron dos tipos de tejidos proliferantes, uno formado por un tejido nodriza o matricial y el segundo tejido proliferante se ubicó en la base de los embriones somáticos diferenciados en etapa torpedo-elongado y cotiledonar.

VI. RECOMENDACIONES

- I. Realizar estudios relacionados con el cultivo de suspensiones celulares finas, para evaluar la capacidad de ese sistema de cultivo en la propagación masiva del guayabo.
- II. Evaluar el empleo de sistemas de inmersión temporal en la embriogénesis secundaria del guayabo.
- III. Realizar estudios más profundos sobre la maduración de los embriones en sistemas de inmersión temporal.
- IV. Realizar estudios de estabilidad genética con el uso de marcadores moleculares.

VII. LITERATURA CITADA

Abbas A., Javed M., Ishfaq M. y Alvi M. 2013. Grafting techniques in guava (*Psidium guajava*). Journal of Agricultural Research 51 (4): 465-471.

Abreu E., González G.R., Ortiz P., Rodríguez R., Domech A. y Garriga M. 2007. Evaluación de vitroplantas de henequén (*Agave fourcroydes* Lem) durante la fase de aclimatización. Cultivos Tropicales 28(1): 5-11.

Adelberg J. 2005. Efficiency in thin-film liquid system for *Hosta* micropropagation. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 81(3): 359-368.

Adelberg J. y Toler J. 2004. Comparison of agar and an agitated, thin-film, liquid system for micropropagation of ornamental elephant ears. HortScience 39(5): 1088-1092.

Afreen F. 2005. Physiological and anatomical characteristics of *in vitro* photoautotrophic plants En: Photoautotrophic (sugar-free medium) micropropagation as a new propagation and transplant production system. Kozai T., Afreen F. y Zobayed S. (Eds) 5th edition. Springer Dordrecht, The Netherland. pp. 59-87.

Afreen F., Zobayed, S. M. A., y Kozai, T. 2002. Photoautotrophic Culture of *Coffea arabusta* Somatic Embryos: development of a bioreactor for large-scale plantlet conversion from cotyledonary embryos. Annals of botany 90(1): 21-29.

Agramonte D., Jiménez F. y Dita M. 1998. Aclimatación. En: Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Pérez J. (Eds) 1^o edición. Santa Clara, Cuba. Instituto de Biotecnología de las Plantas, Universidad Central de las Villas. pp. 193-205.

Akhtar N. 2012. Somatic embryogenesis for high efficiency micropropagation of guava (*Psidium guajava* L.). En: Protocols for Micropropagation of Selected Economically Important Horticultural Plants Lambardi. M., Ozudogru E.A., S.M. Jain (Eds). Humana Press, Springer Science+Business Media, LLC, New York, USA. pp. 161-178.

Akhtar N. y Jaiswal V. S. 1994. Role of somatic embryogenesis and artificial seed production for micropropagation and improvement of

guava (*Psidium guajava* L.). In Proc. Symp. on Role of Plant Tissue Culture in Biotechnology in India, Varanasi, India, p. 2.

Akhtar N., Kumari N., Pandey S., Ara H., Singh M., Jaiswal U., Jaiswal V.S. y Jain M. 2000. Somatic embryogenesis in tropical fruit trees. En: Somatic embryogenesis in woody plants. Jain S., Gupta P. y Newton R. (Eds) 5th edition. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. pp. 93-140.

Akhtar N. 1997. Studies on induction of somatic embryogenesis and production of artificial seeds for micropropagation of a tropical fruit tree guava (*Psidium guajava* L.). Ph. D. thesis, Banaras Hindu University, Varanasi.

Akhtar N. 2010. Evaluation of the efficiency of somatic embryogenesis in guava (*Psidium guajava* L.). Journal Of Horticultural Science and Biotechnology 85(6): 556-562.

Akhtar N. 2013a. Temporal regulation of somatic embryogenesis in guava (*Psidium guajava* L.). The Journal of Horticultural Science and Biotechnology 88 (1): 93-102.

Akhtar N. 2013b. Endogenous polyamines: a temporal cellular modulator of somatic embryogenesis in guava (*Psidium guajava* L.) cv. Allahabad Safeda. Research in Plant Sciences 1(2): 4-14.

Albany N., Vilchez J., Vilorio Z., Castro C. y Gadea J. 2004. Propagación asexual del guayabo mediante la técnica de acodo aéreo. Agronomía Tropical 54(1): 63-73.

Albarrán J., Bertrand B., Lartaud M. y Etienne H. 2005. Cycle characteristics in a temporary immersion bioreactor affect regeneration, morphology, water and mineral status of coffee (*Coffea arabica*) somatic embryos. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 81(1): 27-36.

Aleman L, Berthouly M. y Michaux-Ferreiere N. 1997. Embryogénèses somatique du cacaoyer a partir de pièces florales. Plantations, Recherche Développement 3(4): 225-237.

Ali N., Mulwa R., Mortan M. y Skirvin R. 2003. Micropropagation of guava (*Psidium guajava* L.). Journal of Horticultural Science and Biotechnology 78(5): 739-741.

Amin M. y Jaiswal V. 1987. Rapid clonal propagation of guava through *in vitro* shoot proliferation on nodal explants of mature trees. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 9(3): 235-243.

Amin M. y Jaiswal V. 1988. Micropropagation as an aid to rapid cloning of a guava cultivar. *Scientia Horticulturae* 36: 89-95.

Amin M. y Jaiswal V. 1989. *In vitro* propagation of guava (*Psidium guajava* L.): effects of sucrose, agar and pH on growth and proliferation of shoots. *Bangladesh Journal Botany* 18(1): 1-8.

Andreu P., Marín, J.A. 2005. *In vitro* culture establishment and multiplication of the *Prunus* rootstock 'Adesoto 101' (*P. insititia* L.) as affected by the type of propagation of the donor plant and by the culture medium composition. *Scientia Horticulturae* 106 (2): 258-267.

Arigita L., González A. y Sanchez T. 2002. Influence of CO₂ and sucrose on photosynthesis and transpiration of *Actinidia deliciosa* explants cultured *in vitro*. *Physiologia Plantarum* 115(1): 166-173.

Aular J. y Casares M. 2011. Consideraciones sobre la producción de frutas en Venezuela. *Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal* – Sp. Volumen Especial. 187-198.

Aular J. y Echeverría Y. 2009. Cultivo, producción y poscosecha de la guayaba en Venezuela. En: Natale W., Rozane D. E., Souza H. A. y Amorim D. A. (Eds) *Cultura da goiaba*. Jaboticabal. FCAV-UNESP. pp. 525-555.

Baker C., Wetzstein, H. 1994. Influence of auxin type and concentration on peanut somatic embryogenesis. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 36:273-277.

Balbuena T. S., Santa-Catarina C., Silveira V., Kato M. J. y Floh E. I. S. 2009. *In vitro* morphogenesis and cell suspension culture establishment in *Piper solmsianum* C. DC. (Piperaceae). *Acta Botanica Brasilica* 23(1): 274-281.

Baque M. A., Elgirban A., Lee E. J. y Paek K. Y. 2012. Sucrose regulated enhanced induction of anthraquinone, phenolics, flavonoids biosynthesis and activities of antioxidant enzymes in adventitious root suspension cultures of *Morinda citrifolia* (L.). *Acta Physiologiae Plantarum* 34(2): 405-415.

Barbón R., Nguyen H., Capote A., De Feria M., Quiala E. y Pérez A. 2014. Efecto de la densidad de inoculación en la germinación de embriones somáticos de *Coffea arabica* L. cv. 'Caturra rojo' en sistemas de inmersión temporal RITA®. *Biotecnología Vegetal* 14(2): 91-97.

Barranco L. A., Gómez-Kosky R., Reyes M., Posada L., Freire M. y Herrera I. 2009. Efecto de la densidad de inóculo en la multiplicación y diferenciación de suspensiones celulares embriogénicas en el cultivar híbrido de banano FHIA-18 (*Musa* spp. AAAB). *Revista Colombiana de Biotecnología* 2: 29-36.

Barrera J., Suárez D., Melgarejo L. 2010. Análisis de crecimiento en plantas. En: Experimentos en fisiología vegetal. Melgarejo L. (Ed) Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia. pp. 25-37.

Barrett J., Park Y. y Bonga J. 1997. The effectiveness of various nitrogen sources in white spruce [*Picea maluca* (Moench) Voss] somatic embryogenesis. *Plant Cell Reports* 16: 411-415.

Benelli C., Fabbri A., Grassi S., Lambardi M. y Rugini. E. 2001. Histology of somatic embryogenesis in mature tissue of olive (*Olea europaea* L.). *Journal Horticultural Science and Biotechnology* 76(1): 112-119.

Berthouly M. y Etienne H. 2005. Temporary immersion system: a new concept for use liquid medium in mass propagation. En: Liquid culture systems for *in vitro* plant propagation Hvoslef-Eide A. K. y W. Preil (Eds). Springer, Dordrecht, The Netherlands. pp. 165-195.

Biswas B.K., Yadav A., Joshee N., Yadav A.K. 2005. *In vitro* plant regeneration and genetic transformation to enhance cold hardiness in guava: a nutraceutical fruit. En: Proceedings of 1st international guava symposium. CISH, Lucknow, India. pp. 31-32.

Blanc G., Michaux-Ferrière N., Teisson C., Lardet L. y Carron M.P. 1999. Effects of carbohydrate addition on the induction of somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 59: 103-112.

Cabasson C., Dambier D., Ollitrault P. y Teisson C. 1997. Improvement of *Citrus* somatic embryo development by temporary immersion. *Plant Cell, Tissue Organ Culture* 50: 33-37.

Cailloux F., Julien-Guerrier J., Linossier L., Coudret A. 1996. Long-term somatic embryogenesis and maturation of somatic embryos in *Hevea brasiliensis*. Plant Science 120:185–96.

Cangahuala-Inocente G., Dal Vesco L., Steinmacher D., Torres A. y Guerra M. 2007b. Improvements in somatic embryogenesis protocol in Feijoa (*Acca sellowiana* (Berg) Burret: induction, conversion and synthetic seeds. Scientia Horticulturae 111(3): 228-234.

Cangahuala-Inocente, G. Caprestano C., Ducroquet C. y Guerra M. 2007a. Competência embriogenética em tecidos florais de *Acca sellowiana* (Myrtaceae). Revista Brasileira de Biociências 5(supl. 2): 87-89.

Canhoto J. M., Mesquita J.F. y Cruz G. S. 1996. Ultrastructural changes in cotyledons of pineapple guava (myrtaceae) during somatic embryogenesis. Annals of Botany 78: 513-521.

Canhoto J.M. y Cruz G.S. 1996. Histodifferentiation of somatic embryos in cotyledons of pineapple guava (*Feijoa sellowiana* Berg). Protoplasma 191:34-45

Canhoto J.M., Lopes M.L. y Cruz G.S. 1999. Somatic embryogenesis and plant regeneration in myrtle (*Myrtus communis* L.). Plant Cell, Tissue and Organ Culture 57:13-21

Cañizares D. y Puesme R. 2003. Crecimiento y desarrollo del fruto de guayaba (*Psidium guajava* L.) en Santa Bárbara, Estado Monagas, Venezuela. Revista Científica UDO Agrícola 3(1): 34-38.

Cañizares J. 1968. El guayabo y otras Mirtáceas. Edición Revolucionaria. La Habana. Cuba. 87 p.

Cárdenas-Navarro R., Adamowicz, S. y Robin P. 1999. Nitrate accumulation in plants: a role for water. Journal of Experimental Botany 50(334): 613-624.

Cardoza V. 2008. Tissue culture: The manipulation of plant development. En: Plant biotechnology and genetic: principles, techniques, and applications. Stewart C.N. y Wiley J. (Eds). Inc. Knoxville, Tennessee. pp. 113-134.

Carman J.C. 1990. Embryogenic cells in plant tissue cultures: occurrence and behavior. In *Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 26:746-753.

Carrier D. J., Cunningham J. E., Taylor D. C. y Dunstan D. I. 1997. Sucrose requirements and lipid utilization during germination of interior spruce (*Picea glauca* Engelmännii complex) somatic embryos. *Plant Cell Reports* 16(8): 550-554.

Casassa A., Matheus J., Crozzoli R., Bravo V. y González C. 1997. Respuesta de algunas selecciones de guayabo al nematodo *Meloidogyne incognita* en el municipio Mara del estado Zulia. *Venezuela Fitopatología Venezolana* 10:5-8.

Celestino C., Hernández H., López D. 2005. La embriogénesis somática como elemento central de la biotecnología forestal. *Investigación Agraria* 14(3): 345-357.

Chandra R. y Mishra M. 2005. Biotechnological interventions for improvement of guava (*Psidium guajava* L.). En: *I International Guava Symposium* 735. pp. 117-125.

Chandra R., Bajpai A. Gupta S. y Tiwari R. K. 2004. Embryogenesis and plant regeneration from mesocarp of *Psidium guajava* L. (guava). *Indian Journal of Biotechnology* 3(2): 246-248.

Chandra R., Mishra M., Abida M. y Singh D. B. 2007. Triazole mediated somatic embryogenesis in guava (*Pisidium guajava* L.) cv. Allahabad Safeda. *Acta horticulturae* 735: 133-138.

Chengalrayan K., Sathaye S., y Hazra, S. 1994. Somatic embryogenesis from mature embryo-derived leaflets of peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Plant Cell Reports* 13(10): 578-581.

Chengalrayan V. B., Mhaske y S. Hazra. 1997. High-frequency conversion of abnormal peanut somatic embryos. *Plant Cell Reports* 16: 783-786.

Choi Y.E. y Jeong J.H. 2002. Dormancy induction of somatic embryos of Siberian ginseng by high sucrose concentrations enhances the conservation of hydrated artificial seeds and dehydration resistance. *Plant Cell Reports* 20: 1112-1116.

Clavijo J. 1989. Análisis del crecimiento en malezas. Revista Comalfi 26: 12-16.

Colova-Tsolova V. M., Bordallo P. N., Phills B. R. y Bausher M. 2007 Synchronized somatic embryo development in embryogenic suspensions of grapevine *Muscadinia rotundifolia* (Michx.) Small. Vitis 46: 15-18.

Concepción O., Nápoles L., Pérez A., Peralta N. y Trujillo R. 2004. Regeneración de brotes adventicios en hojas de guayaba (*Psidium guajava* L.) cultivadas *in vitro*. Revista Colombiana de Biotecnología 4(2): 54-61.

Copeland L. y McDonald M. 1995. Principles of Seed Science and Technology. 3th edition. Chapman & Hall. New York. pp. 400-409.

Coutos-Thévenot P., Maes O., Jouenne T., Mauro M.C., Jouanneau J.P., Boulay M., Deloire A. y Guern J. 1992. Extracellular protein patterns of grapevine cell suspensions in embryogenic and nonembryogenic situations. Plant Science 86:137-145.

Cruz G.S., Canhoto J. M. y Abreu M. 1990. Somatic embryogenesis and plant regeneration from zygotic embryos of *Feijoa sellowiana* Berg. Plant Science 66:263-270.

Curtis W. 2005. Application of biorreactor design principles to plant micropropagation. En: Liquid culture systems for in vitro plant propagation. Anne Kathrine Hvoslef-Eide y Walter Preil (Eds). Springer. Dordrecht, Holanda. p. 21-40.

da Silva C. M., Monter Á. V., García P. S., González G. A., Mendoza M. N. y Posadas L. 2004. Efecto del potencial osmótico y contenido de Ca en el medio de cultivo sobre la distribución de Ca²⁺ y K, producción de biomasa y necrosis apical de vid "R110". Interciencia 29(7): 384-388.

Dal Vesco L. 1998. Indução e controle da embriogênese somática *in vitro* na goiabeira serrana (*Feijoa sellowiana* Berg.). Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil. p. 82.

Dal Vesco L. y Guerra M. 2001. The effectiveness of nitrogen sources in Feijoa somatic embryogenesis. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 64:19-25.

Das D., Reddy M., Upadhyaya K y Sopory S. K. 2002. An efficient leaf-disc culture method for the regeneration via somatic embryogenesis and transformation of grape (*Vitis vinifera* L.). *Plant Cell Reports* 20: 991-1005.

De Fera Silva M., González E. J., Rodríguez R. B., Pérez A. C., Milián M. C. y Mendoza E. Q. 2005. Diferenciación y germinación de embriones somáticos de *Coffea arabica* L. cv. Catimor 9722 obtenidos en agitador orbital. *Biotecnología Vegetal* 5(2): 95-101.

De la Torre F., Saporta R., Sanjurjo L., Segura A. y Vidal J. 2012. Relationship among growth curve, nutrient consumption and genetic transformation efficiency of 'Albariño' (*Vitis vinifera*) cell suspensions. *Vitis* 51(2): 73-78.

Deng M. D., y Cornu D. 1992. Maturation and germination of walnut somatic embryos. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 28(2): 195-202.

Deo P. C., Tyagi A. P., Taylor M., Harding R. y Becker D. 2011. Factors affecting somatic embryogenesis and transformation in modern plant breeding. *The South Pacific Journal of Natural and Applied Sciences* 28(1): 27-40.

Díaz L., Namur J., Bollati S. y Arce O. 2010. Acclimatization of Phalaenopsis and Cattleya obtained by micropropagation. *Revista Colombiana de Biotecnología* 12(2): 27-40.

Durham R. E. y Parrott W. A. 1993. Repetitive somatic embryogenesis from peanut cultures in liquid medium. *Plant Cell Reports* 11(3): 122-125.

Durzan D. J. 1982. Nitrogen metabolism and vegetative propagation of forest trees. En: *Tissue Culture in Forestry*. Bonga, J.M. y Durzan, D.J. (Eds) Springer Netherlands. pp. 256-324.

Dussert S., Verdeil J. L. y Buffard-Morel J. 1995. Specific nutrient uptake during initiation of somatic embryogenesis in coconut calluses. *Plant Science* 111(2): 229-236.

Dustan D.I., Tautorus T.E. y Thorpe T.A. 1995. Somatic embryogenesis in woody plants. En: In vitro embryogenesis in plants. Thorpe T.A. (Eds). Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, Netherlands. pp. 471-538.

Elkonin A. y Pakhomova N. 2000. Influence of nitrogen and phosphorus on induction embryogenic callus of sorghum. Plant Cell Tissue and Organ Culture 61:115-123.

Escalant J., Teisson C. y Côte F. 1994. Amplified somatic embryogenesis from male flowers of triploid banana and plantain cultivars (*Musa* spp.). In Vitro Cellular and Developmental – Plant 30: 181-186

Etienne H. y Berthouly M. 2002. Temporary immersion systems in the plant micropropagation. Plant Cell Tissue and Organ Culture 69: 215-231.

Etienne H., Bertrand B., Anthony F., Côte F. y Berthouly M. 1997a. L'embryogenèse somatique, un outil pour l'amélioration génétique du café. En: ASIC (Eds) 17th Int Sci Colloquium Coffee. ASIC, Vevey, Switzerland, pp. 457-465.

Etienne H., M. Lartaud N., Michaux-Ferriere M.P., Carron M. Berthouly y Teisson C. 1997. Improvement of somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis* (Müll. Arg.) using the temporary immersion technique. In Vitro Cell Development Biology-Plant 33: 81-87.

Etienne H., Montoro P., Michaux-Ferriere N. y Carro M. P. 1993. Water and histological parameters during the maturation of *Hevea brasiliensis* somatic embryos: effects of desiccation, medium osmolarity and abscisic acid. Journal Experimental Botany 44(267): 1613-1619.

Etienne-Barry D., Bertrand B., Vasquez N. y Etienne H. 1999. Direct sowing of *Coffea arabica* somatic embryos mass produced in a bioreactor and regeneration of plants. Plant Cell Report 199:111-119.

Evans D., Sharp W. y Flick C. 1981. Growth and behavior of cell cultures: embryogenesis and organogenesis. En: Plant Tissue Culture: methods and applications in agriculture. Thorpe, T. (Ed) New York, Academic Press. pp. 45-113.

Fehér A., Pasternak T.P. y Dudits D. 2003. Transition of somatic plant cell to an embryogenic state. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 74: 201-228.

Feldmann G., Dhara S., Fendrich V., Bedja D., Beaty R., Mullendore M. y Maitra A. 2007. Blockade of hedgehog signaling inhibits pancreatic cancer invasion and metastases: a new paradigm for combination therapy in solid cancers. *Cancer Research* 67(5): 2187-2196.

Fernández-Guijarro B., Celestino C., Toribio M. 1995. Influence of external factors on secondary embryogenesis and germination in somatic embryos from leaves of *Quercus suber* L. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 41:99-106.

Ferreira E. y Yoshimitsu S. 2009. Induction of somatic embryogenesis in immature seeds of guava tree cv. *Revista Brasileira de Fruticultura* 31(2): 21-29.

Flores G., Dastmalchi K., Wu S., Whalen K., Dabo A., Reynertson K., y Kennelly E. 2013. Phenolic-rich extract from the Costa Rican guava (*Psidium friedrichsthalianum* L.) pulp with antioxidant and anti-inflammatory activity. Potential for COPD therapy. *Food Chemistry* 141(2): 889-895.

Fraga M.F., Cañal M.J., Rodríguez R. 2002. *In vitro* morphogenic potential of differently aged *Pinus radiata* trees correlates with polyamines and DNA methylation levels. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 70: 139-145.

Freire M. 2003 Aspectos básicos de la embriogénesis somática. *Biotecnología Vegetal* 3(4): 195-209

Gaj M.D. 2004. Factors influencing somatic embryogenesis induction and plant regeneration with particular reference to *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Growth Regulator* 43:27-47.

Gamborg O.L., Miller R.A. y Ojima K. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research* 50(1):151-8.

García-Águila L., Gómez-Kosky R., Alvarado-Capó Y., Sarría Z. y Reyes M. 2010. Efecto de la densidad de inoculación en la formación y morfología de los embriones somáticos de plátano (*Musa* spp.

AAAB, cv. híbrido FHIA-21). Revista Colombiana de Biotecnología 12(2): 240-247.

Garin E., Bernier-Cardou M., Isabel N., Klimaszewska K., Plourde A. 2000. Effect of sugars, amino acids, and culture technique on maturation of somatic embryos of *Pinus strobus* on medium with two gellan gum concentrations. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 62:27-37.

Gavish H., Vardi A. y Fluhr R. 1992. Suppression of somatic embryogenesis in *Citrus* cell cultures by extracellular proteins. Planta 186: 511-517.

George E. F. 1993. Plant Propagation by Tissue Culture: Part 1. The Technology. Exegetics Ltd., Edington, pp. 322-326.

George E. F., Hall M. A. y De Klerk G. J. 2008. The components of plant tissue culture media I: macro-and micro-nutrients En: Plant propagation by tissue culture. George E. F., M. A. Hall y De Klerk G. J. (Eds). Springer Netherlands. pp. 65-113.

Georgiev V., Schumann A., Pavlov A. y Bley T. 2014. Temporary immersion systems in plant biotechnology. Engineering in Life Sciences 14(6): 607-621.

Gómez C., Ríos D. y Olate M. S. 2013. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Eucalyptus globulus* Labill. Interciencia 38(12): 874-880.

Gómez R. 1998. Embriogénesis Somática. En: Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Pérez J. (Eds). 1º edición. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central de las Villas. Santa Clara. Cuba. 13-22 p.

Gómez R., Posada L., Reyes M. y Núñez M. 1996. Empleo de sustancias biorreguladoras (Biobras-6) en la conversión y adaptación de plantas de fruta bomba (*Carica papaya* L.) var. Maradol Rojo obtenidas a partir de embriones somáticos. Resúmenes IV Coloquio Internacional de Biotecnología de las Plantas, Santa Clara, 58.

González H., García-Águila L., Gómez-Kosky R., Rodríguez A., Pérez B., Rodríguez E. 2014. Efecto de la densidad de inoculación en la maduración de embriones somáticos de plátano cv. 'FHIA-21' (*Musa* AAAB). Biotecnología Vegetal 14 (2): 73- 79.

Gray D.J. 1987. Quiescence in monocotyledonous and dicotyledonous somatic embryos induced by dehydration. *Hortscience* 22:810–814.

Griga M. 2000. Morphological alterations in sterile mutant of *Pisum sativum* obtained via somatic embryogenesis. *Biología Plantarum* 43 (2): 161-165.

Guerra M. P., Cangahuala-Inocente G. C., Dal Vesco L. L., Pescador R. y Caprestano C. A. 2013. Micropropagation Systems of Feijoa (*Acca sellowiana* (O. Berg) Burret). *Protocols for Micropropagation of Selected Economically-Important Horticultural Plants*. Humana Press. pp. 45-62.

Guerra M. P., Pescador R., Dal Vesco L.L., Ducroquet J.P., Nodari R.O. y Dos Reis M. 2001. Somatic embryogenesis in goiabeira serrana: genotype response, auxinic shock and synthetic seeds. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 13(2):117-128.

Guerra M.P., Pescador R., Dal Vesco L.L., Nodari R.O. y Ducroquet J.P. 1997. *In vitro* morphogenesis in *Feijoa sellowiana*: Somatic embryogenesis and plant regeneration. *Acta Horticulture* 452: 27-36.

Guo X., Yoshitomi H., Gao M., Qin L., Duan Y., Sun W. y Liu, T. 2013. Guava leaf extracts promote glucose metabolism in SHRSP. Z-Leprfa/Izm rats by improving insulin resistance in skeletal muscle. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 13(1): 52.

Gupta P. K. y Durzan D. J. 1987. Biotechnology of somatic polyembryogenesis and plantlet regenerafion in loblolly pine. *Biotechnology* 5:147-151.

Gupta P.K. y Timmis R. 2005. Mass propagation of conifer trees in liquid cultures—progress towards commercialization. En: *Liquid culture systems for in vitro plant propagation*. Hvoslef-Eide AK, Preil W (Eds). Springer, Dordrecht. pp. 389–402.

Haberlandt S.C. 1902. Kulturversuche mit isolierten pflanzenzellen. *Akademie der Wissenschaften in Wien, Sitzungsberichte, Mathematisch-naturwissenschaftliche Klasse, Abteilung* 111(1):69-92.

Habiba R., El-Shami Z., Gad M. y Ibrahim M. 2008. Some physical and chemical characteristics of frozen guava puree as affected by pre-freezing treatments and storage time. *Journal of the Saudi Society for Food and Nutrition* 3(1): 17-30.

Haccius B. 1978. Question of unicellular origin of non-zygotic embryos in callus cultures. *Phytomorphology* 28(1): 78-81.

Halperin W. 1995. *In vitro* embryogenesis: some historical issues and unresolved problems. En: *In vitro* embryogenesis in plants. Thorpe T.A. (Eds). Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, Netherlands. pp. 155-203.

Hartmann H. y Kester D. 1968. Plant propagation: principles and practices. 2th edition. Prentice-Hall Inc., Englewood Cliffs. 702p.

Hassimotto N. M., Genovese M. I., Lajolo F. M. 2005. Antioxidant activity of dietary fruits, vegetables, and commercial frozen fruit pulps. *Journal Agricultural Food Chemistry* 53: 2928–2935.

Hazarika B. N. 2003. Acclimatization of tissue-cultured plants. *Current Science* 85(12): 1704-1712.

Heo J. y Kozai T. 1999. Forced ventilation micropropagation system for enhancing photosynthesis, growth and development of sweet potato plantlets. *Environment Control in Biology* 37: 83–92.

Hong P.I., Chen J.T. y Chang W.C. 2008. Promotion of direct somatic embryogenesis of *Oncidium* by adjusting carbon sources. *Biologia Plantarum* 52: 597-600.

Hunt R. 1990. Basic growth analysis: plant growth analysis for beginners. Unwin Hyman, Londres. 112 p.

Hyams D. 2005. Curve expert version 1.4. A comprehensive curve fitting package for Windows. <http://www.curveexpert.net/>

Ikram-ul-Haq y Zafar Y. 2004. Effect of nitrates on embryo induction efficiency in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *African Journal of Biotechnology* 3(6):319–323.

Iraqi D., Le V. Q., Lamhamedi M. S. y Tremblay F.M. 2005. Sucrose utilization during somatic embryo development in black spruce: involvement of apoplastic invertase in the tissue and of extracellular invertase in the medium. *Journal Plant Physiology* 162: 115–124.

Iraqi D. y Tremblay F. M. 2001. Analysis of carbohydrate metabolism enzymes and cellular contents of sugars and proteins during spruce somatic embryogenesis suggests a regulatory role of exogenous

sucrose in embryo development. Journal Experimental Botany 52: 2301-2311.

Jain S. M. y Gupta P. K. (Eds) 2005. Protocols for somatic embryogenesis in woody plants (Vol. 77). Dordrecht: Springer. 585 p.

Jain S. M., Gupta P. K. y Newton R. J. (Eds) 2000. Somatic embryogenesis in woody plants (Vol. 6). Springer Science & Business Media. pp. 455-478.

Jaiswal V. y Amin M. 1987. *In vitro* propagation of guava from shoot culture mature trees. Journal of Plant Physiology 130(1): 7-12,

Jaiswal V.S. y Amin M.N. 1992. Guava and jackfruit. En: Biotechnology of perennial fruit crops, Biotechnology in agriculture. Hammerschlag F. A. y Litz R.E. (Eds). Vol.8. CAB International, Wallingford, UK. pp. 421-431.

Jiménez J., Hernández I., López-Vela D., Toribio M. y Alegre J. 2005. Desarrollo de embriones somáticos de alcornoque en biorreactores de inmersión temporal. VI Reunión de la Sociedad Española de Cultivo In Vitro de Tejidos Vegetales. p 38.

Jiménez V.M. 2005. Involvement of plant hormones and plant growth regulators on *in vitro* somatic embryogenesis. Plant Growth Regulation 47: 91-110.

Jiménez-Escrig A., Rincón M., Pulido R. y Saura-Calixto F. 2001. Guava fruit (*Psidium guajava* L.) as a new source of antioxidant dietary fiber. Journal of Agricultural and Food Chemistry 49(11): 5489-5493.

Joseph B. y Priya M. 2011. Review on nutritional, medicinal, and pharmacological properties of guava (*Psidium guajava* L.). International Journal of Pharma and Bio Sciences 2: 53-69.

Kamada H., Kobayashi K., Kiyosue T. and Harada H. 1989. Stress induced somatic embryogenesis in carrot and its application to synthetic seed production. In Vitro Cellular and Developmental Biology 25(12): 1163-1166.

Kamle M., Kumar P., Bajpai A., Kalim S. y Chandra R. 2014. Assessment of genetic fidelity of somatic embryogenesis regenerated

guava (*Psidium guajava* L.) plants using DNA-based markers. New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science 42(1): 1-9.

Karami O. y Saidi A. 2010. The molecular basis for stress-induced acquisition of somatic embryogenesis. Molecular Biology Reports 37(5): 2493-2507.

Kareem A., Jaskani M., Fatima B. y Sadia B. 2013. Clonal multiplication of guava through softwood cuttings under mist conditions. Pakistan Journal of Agricultural Sciences 50(1): 23-27.

Karunaratne S., Gamage C., y Kovoov A. 1991. Leaf maturity, a critical factor in embryogenesis. Journal Plant Physiology 139:27-31.

Khattak M., Malik M. y Khan M. 2001. Macro-propagation of Guava (*Psidium guajava* L.). Journal of Biological Sciences 1(3): 111-112.

Kim Y. J., Park T., Kim H. S., Such S. K., Kim H. S., Yun S. J. 2004. Effective multiplication of somatic embryos using suspension culture and regeneration in soybean. Journal Plant Biotechnology 6:91-96.

Kim Y.W., Youn Y., Noh E.R. y Kim J.C. 1999. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature zygotic embryos of Japanese larch (*Larix leptolepis*). Plant Cell, Tissue and Organ Culture 55: 95-101.

Kiss J., Hesky L., Kiss E. y Gyulai G. 1992. High efficiency adventive embryogenesis on somatic embryos of anther filament and immature proembryo origin in horse chestnut (*Aesculus hippocastanum* L.) tissue culture. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 30:59-64.

Kozai T. 2005. Introduction En: Photoautotrophic (sugar-free medium) micropropagation as a new micropropagation and transplant production system. Kozai T., Afreen F., Zobayed S. (Eds), Springer, Dordrecht, The Netherlands. 1-5.

Kozai T. y Kubota C. 2005. Concepts, definitions, ventilation methods, advantages and disadvantages. En: Photoautotrophic (sugar-free medium) micropropagation as a new micropropagation and transplant production system. Kozai T., Afreen F., Zobayed S., Springer, Dordrecht, The Netherlands. 19-30.

Kozai T., K. Fujiwara y Giacomelly G. 1991. Environmental control in micropropagation. *American Society of Agricultural and Biological Engineers Meeting*. 9: 11-13.

Laguado N., Pérez E., Alvarado C., y Marín M. 1999. Características físico-químicas y fisiológicas de frutos de guayaba de los tipos Criolla Roja y San Miguel procedentes de dos plantaciones comerciales. *Revista de la Facultad de Agronomía (LUZ)* 16(4): 382-397.

Lee E. K., Cho D. Y. y Soh W. Y. 1997. Effect of humidity on somatic embryogenesis in cotyledon explant culture of carrot. *Journal Plant Biololgy* 40:89-94.

Lee E. K., Cho D. Y. y Soh W. Y. 2001. Enhanced production and germination of somatic embryos by temporary starvation in tissue cultures of *Daucus carota*. *Plant Cell Reports* 20:408-415.

Li X., Krasnyanski S. F. y Korban, S. S. 2002. Somatic embryogenesis, secondary somatic embryogenesis, and shoot organogenesis in Rosa. *Journal Plant Biology* 159: 313-319.

Litz R. E. 1984a. *In vitro* somatic embryogenesis from callus of Jaboticaba, *Myrciaria cauliflora*. *HortScience* 19(1): 62-64.

Litz R. E. 1984b. *In vitro* responses of adventitious embryos of two polyembrionic Eugenia species. *HortScience* 19(5): 720-722.

Litz R. E. y Gray D. J. 1995. Somatic embryogenesis for agricultural improvement. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 11(4): 416-425.

Litz R. y Jaiswal V. 1991. Micropropagation of tropical and subtropical fruits. En: *Micropropagation*. Deberg P. y Zimmerman R. (Eds.). Kluwer Academic Publishers. Netherlands. 247-263.

Litz R.E., Chavéz V. M. y Moon P.A. 1998. Induction of embryogenic cultures from mature-phase tropical and subtropical trees and control of somatic embryo maturation and germination. En: Bruns S., Mantell S., Tragardh C., Viana A. M. (Eds) *Proceedings of an IFS Workshop Recent advances in biotechnology for tree conservation and management Florianopolis, Brazil*. 232-243.

Liu G. y Bao M. 2003. Adventitious shoot regeneration from *in vitro* cultured leaves of London plane tree (*Platanus acerifolia* Willd.) Plant Cell Reports 20 (7): 640-644.

LoSchiavo F., Pitto L., Giuliano G., Torti G., Nuti-Ronchi V., Marazziti D., Vergara R., Orselli S. and Terzi M. 1989. DNA methylation of embryogenic carrot cell cultures and its variations as caused by mutation, differentiation, hormones and hypomethylating drugs. Theoretical and Applied Genetics 77(3): 325-331.

Lozoya X., Reyes H., Chávez M., Martínez M., Soto Y. y Doubova S. 2002. Intestinal anti-spasmodic effect of a phytodrug of *Psidium guajava* folia in the treatment of acute diarrheic disease. Journal Ethnopharmacolgy 83(1-2): 19-24.

Mallón R., Covelo P. y Vieitez A. M. 2012. Improving secondary embryogenesis in *Quercus robur*: application of temporary immersion for mass propagation. Trees 26(3):731-741.

Marquina V., Araujo L., Ruíz J., Rodríguez A. y Vit P. 2008. Composición química y capacidad antioxidante en fruta, pulpa y mermelada de guayaba (*Psidium guajava* L.). Archivos Latinoamericanos de Nutrición 58(1): 98-102.

Martínez J., Consuelo M., Reyes A., Hernández S., Padilla J. y Mayek N. 2004. Diversidad fenotípica y genética en huertas de guayabo de Calvillo, Aguascalientes. Revista Fitotecnia Mexicana 27(3):243-249.

Martre, P., Lacan D., Just D. y Teisson C. 2001. Physiological effects of temporary immersion on *Hevea brasiliensis* callus. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 67(1): 25-35.

Mauri, P. V. y Manzanera J. A. 2003. Induction, maturation and germination of holm oak (*Quercus ilex* L.) somatic embryos. Plant cell, Tissue and Organ Culture 74(3): 229-235.

McCown B. H. y Lloyd G. 1981. Woody plant medium (WPM) a mineral nutrient formulation for microculture of woody plant-species. HortScience 16(3): 453-453.

Meghwal P., Sharma H. y Singh S. 2010. Micropropagation studies on guava. Indian Journal of Horticulture 67(4): 55-58.

Meijer E. G. y Brown D. C. 1988. Inhibition of somatic embryogenesis in tissue culture of *Medicago sativa* by aminoethoxyvinylglycine, amino-oxyacetic acid, 2,4-dinitrophenol and salicylic acid at concentrations which do not inhibit ethylene biosynthesis and growth. *Journal Experimental Botany* 39: 263-270.

Merkle S. A. 1995. Strategies for dealing with limitations of somatic embryogenesis in hardwood trees. *Plant Tissue Cultured and Biotechnology* 1(3): 112-120

Merkle S. A. y Watson-Pauley B. A. 1994. *Ex vitro* conversion of pyramid magnolia somatic embryos. *HortScience* 29(10): 1186-1188.

Mhaske V.B., Chengalrayan K. y Hazra S. 1998. Influence of osmotic and abscisic acid on triglyceride accumulation in peanut somatic embryos. *Plant Cell Report* 17: 742-746.

Michaux-Ferrière N., Grout H. y Carron M.P. 1992. Origin and ontogenesis of somatic embryos in *Hevea brasiliensis* (Euphorbiaceae). *American Journal of Botany* 79(2): 174-180.

Mishra M., Chandra R., Pati R. y Bajpai A. 2007. Micropropagation of Guava (*Psidium guajava* L.). *Acta Horticulturae* 735: 155-158.

Molero T., Molina J. y Casassa-Padrón A. 2003. Descripción morfológica de selecciones de *Psidium guajava* L. tolerantes y *Psidium friedrichsthalianum* (Berg.) Nied resistente a *Meloidogyne incognita* en el estado Zulia, Venezuela. *Revista de la Facultad de Agronomía (LUZ)* 20: 178-192.

Montaldi E. 1995. Principios de fisiología vegetal. Ediciones Sur, La Plata, Argentina. 298.

Moura E. F. y Motoike S. Y. 2009. Induction of somatic embryogenesis in immature seeds of guava tree cv. Paluma. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 31(2): 507-511.

Mukilarasi V., Pavithera S., Suchitra V., Nayak B. K. y Nanda A. 2015. Comparative antibacterial analysis of hydro-alcoholic leaf extract of three medicinal plants by soxhlet extraction process. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research* 7(4): 131-135.

Muralidharan E. M. y Mascarenhas A. F. 1995. Somatic embryogenesis in Eucalyptus. En: Somatic embryogenesis in woody plants, Springer Netherlands. pp. 23-40.

Murashige T. y Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum* 15(3): 473-497.

Nair K., Brahman G., Radhika M., Dripta R., Ravinder P., Balakrishna N. y Abrams S. 2013. Inclusion of guava enhances non-heme iron bioavailability but not fractional zinc absorption from a rice-based meal in adolescents. *The Journal of Nutrition* 143(6): 852-858.

Niemenak N., Saare-Surminski K., Rohsius C., Ndoumou D. y Lieberei R. 2008. Regeneration of somatic embryos in *Theobroma cacao* L. in temporary immersion bioreactor and analyses of free amino acids in different tissues. *Plant Cell Reports* 27(4): 667-676.

Nogueira S., Nagai V., Braga N., Novo M. y Camargo M. 1994. Growth analysis of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Scientia Agricola* 51(3): 430-435.

Norgaard J. V. 1997. Somatic embryo maturation and plant regeneration in *Abies nordmanniana* Lk. *Plant Science* 124: 211-221.

Nugent G., Chandler S. F., Whiteman P. y Stevenson T. W. 2001. Somatic embryogenesis in *Eucalyptus globulus*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 67(1): 85-88.

Ocampo F. y Nuñez V. 2007. Propagación *in vitro* de (*Psidium guajava* L.) mediante organogénesis directa a partir de segmentos nodales. *Revista Corpoica-Ciencia y Tecnología Agropecuaria* 8(1): 22-27.

Olmos S., Luciani G. y Galdeano E. 2004. Métodos de propagación y conservación de germoplasma. En: *Biotecnología y Mejoramiento Vegetal*. Echenique V., Rubinstein C. y Mroginski L. (Eds). 1º edición. Ediciones INTA. Buenos Aires, Argentina. pp. 163-172.

Ordóñez L. y Vázquez A. 2010. Effect of processing and storage time on the vitamin C and lycopene contents of nectar of pink guava (*Psidium guajava* L.), *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 60: 280-28.

Orellana P. 1998a. Introducción a la propagación masiva. En: Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Compilado por: Pérez J. 1º edición. Santa Clara, Cuba. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central de las Villas. pp. 125-133.

Orellana P. 1998b. Propagación vía organogénesis. En: Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Compilado por: Pérez J. 1º edición. Santa Clara, Cuba. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central de las Villas. pp. 151-178.

Orozco Sánchez F., Hoyos Sánchez R. y Arias Zabala M. 2002. Establecimiento de un cultivo de células en suspensión de *Eucalyptus cinérea*. Revista Colombiana de Biotecnología 4(1): 43-48.

Ozawa K., Ling D. y Komamine A. 1996. High-frequency somatic embryogenesis from small suspension-cultured clusters of cells of an interspecific hybrid of *Oryza*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 46:157-159.

Palomo A. 2003. Análisis de crecimiento de variedades de algodón transgénicas y convencionales. Revista Fitotecnia Mexicana 24(2): 197-202.

Papadatou P., Pontikis C.A., Ephtimiadou E. y Lydaki M. 1990. Rapid multiplication of guava seedlings by in vitro shoot tip culture. Scientia Horticulturae 45: 99-103.

Parra R. y Amo-Marco J. B. 1998. Secondary somatic embryogenesis and plant regeneration in myrtle (*Myrtus communis* L.) Plant Cell Reports 18:325-330.

Parrot W. 1993. Cells culture techniques. En: Biotechnology applications for banana and plantain improvement. Reunion INIBAP, San Jose, Costa Rica. Proceedings. Montpellier, France. pp. 183- 191.

Parrott W. A. y Bailey M. A. 1993. Characterization of somatic embryogenesis of recurrent alfalfa on auxin-free medium. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 32: 69-76.

Pascual L. y Marin, J. A. 2005. A liquid pulse increased shoot and root regeneration from leaf explants of adult *Prunus* rootstocks. Scientia Horticulturae 106:582-592.

Pasternak T.P., Prinsen E., Ayaydin F., Miskolczi P., Potters G., Asard H., Van Onckelen H., Dudits D. y Fehér A. 2002. The role of auxin, pH and stress in the activation of embryogenic cell division in leaf protoplast-derived cells of alfalfa (*Medicago sativa* L.). Plant Physiology 129: 1807-1819.

Peña H., Díaz J. y Martínez T. 1996. Fruticultura Tropical. 2º parte. ICFES. Santa Fe de Bogotá. Colombia. 208 p.

Peña L. 2008. Biotecnología vegetal: transformación genética de plantas. En: Fundamentos de Fisiología Vegetal. Compilado por: Azcon-Bieto J. y Talón M. Segunda edición. Madrid, España. McGraw-Hill-Interamericana de España, S.A.U. pp.599-616.

Peñate L., Concepción O., Aragón C., Rodríguez R., González J., Escalona M., Cid M. y Pina. D. 2007. Evaluación del efecto de tres condiciones de cultivo *in vitro* en la calidad de plántulas de caña de azúcar propagadas en Biorreactores de Inmersión Temporal. Biotecnología Vegetal 7(3): 161-169.

Perán-Quesada R., Sánchez-Romero C., Barceló-Muñoz A. y Pliego-Alfaro F. 2004. Factors affecting maturation of avocado somatic embryos. Scientia Horticulturae 102(1): 61-73.

Pérez J. 1998. Variación somaclonal. En: Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Pérez J. (Eds) 1º edición. Instituto de Biotecnología de las Plantas, Universidad Central de las Villas. Santa Clara, Cuba. 105-121.

Pescador R., Kerbauy G. B., Viviani D. y Kraus J. E. 2008. Anomalous somatic embryos in *Acca sellowiana* (O. Berg) Burret (Myrtaceae). Brazilian Journal of Botany 31(1): 155-164.

Pinto G., Araújo C., Santos C. y Neves L. 2013. Plant regeneration by somatic embryogenesis in *Eucalyptus* spp.: current status and future perspectives. Southern Forests: a Journal of Forest Science 75(2): 59-69.

Pinto G., Santos C., Neves L. y Araújo C. 2002. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Eucalyptus globulus* Labill. Plant Cell Reports 21(3): 208-213.

Pinto G., Silva S., Park Y. S., Neves L., Araújo C. y Santos C. 2008. Factors influencing somatic embryogenesis induction in *Eucalyptus*

globulus Labill.: basal medium and anti-browning agents. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 95(1): 79-88.

Pliego F. y Barceló A. 2001. Morfogénesis *in vitro*. En: Introducción a la biotecnología vegetal: métodos y aplicaciones. Caballero J.L., Valpuesta V. y Muñoz B. (Eds) Publicaciones Obra Social y Cultural Cajasur. Córdoba, España. pp. 231-242.

Pommer C. V. y Murakami K. R. 2009. Breeding guava (*Psidium guajava* L.). En: Breeding plantation tree crops: Tropical species. Jain S. M. y Priyadarshan P. M. (Eds). Springer Science + Business Media LLC, New York, USA. pp. 83-120.

Pontikis C. 1996. *Psidium guajava* L. (Guava) En: Bajaj Y. (Eds). Biotechnology in agriculture and forestry. vol. 35 trees IV. pp. 309-319.

Prakash M. G. y Gurumurthi K. 2010. Effects of type of explant and age, plant growth regulators and medium strength on somatic embryogenesis and plant regeneration in *Eucalyptus camaldulensis*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 100(1): 13-20.

Quiala E., Cañal M. J., Meijón M., Rodríguez R., Chávez M., Villedor L. y Barbón R. 2012. Morphological and physiological responses of proliferating shoots of teak to temporary immersion and BA treatments. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 109(2):223-234.

Quiroz-Figueroa F. R., Rojas-Herrera R., Galaz-Avalos R. M. y Loyola-Vargas V. M. 2006. Embryo production through somatic embryogenesis can be used to study cell differentiation in plants. Plant Cell Tissue Organ and Culture 86(3): 285-301.

Quiroz-Figueroa F.R., Fuentes-Cerda C.F., Rojas-Herrera R. y Loyola-Vargas, V.M. 2002. Histological studies on the developmental stages and differentiation of two different somatic embryogenesis systems of *Coffea arabica*. Plant Cell Reports 20:1141-1149.

Raemakers C. J., Jacobsen E. y Visser R. G. 1995. Secondary somatic embryogenesis and applications in plant breeding. Euphytica 81: 93-107.

Rai M. K., Akhtar N. y Jaiswal V. S. 2007. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Psidium guajava* L. cv. Banarasi local. Scientia Horticulturae 113(2): 129-133.

Rai M. K., Asthana P., Jaiswal V. S. y Jaiswal U. 2010. Biotechnological advances in guava (*Psidium guajava* L.): recent developments and prospects for further research. *Trees* 24(1): 1-12.

Rai M. K., Jaiswal, V. S. y Jaiswal U. 2008. Effect of ABA and sucrose on germination of encapsulated somatic embryos of guava (*Psidium guajava* L.). *Scientia horticulturae* 117(3): 302-305.

Rai M., Jaiswal V. y Jaiswal U. 2009. Shoot multiplication and plant regeneration of guava (*Psidium guajava* L.) from nodal explants of *in vitro* raised plantlets. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research* 17(1):29-38.

Ramage C. M. y Williams R. R. 2002. Mineral nutrition and plant morphogenesis. *In vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 38(2): 116-124.

Ramírez M., Urdaneta A. y Marín M. 1999. Injertación y estaquillado en el guayabo bajo condiciones de bosque muy seco tropical. *Revista de la Facultad de Agronomía (LUZ)*: 16: 36-42.

Reinert J. 1958. Untersuchungen über die Morphogenese an Gewebekulturen. *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft* 71: 15 – 1

Ribas M., Flórez I. y González M. 2008. La respiración de las plantas. En: *Fundamentos de Fisiología Vegetal*. Azcon-Bieto J. y Talón M. (Eds). 2º edición. Madrid, España. McGraw-Hill-Interamericana de España, S.A.U. pp. 265- 286.

Rodríguez L., Corchuelo G. y Ñustez C. 2003. Influencia del espaciamiento entre plantas sobre la morfología y el crecimiento de la papa (*Solanum tuberosum* L. cv. Parda pastusa) bajo dos ambientes contrastantes. *Agronomía Colombiana* 21(3): 210-219.

Rodríguez R., Fernández M., Pacheco J., Cañal M. 2005. Envejecimiento vegetal, una barrera a la propagación, alternativas. En: *Biotecnología vegetal en especies leñosas de interés forestal*. Sánchez M. y Ríos D. (Eds) 1º edición. Imprenta Austral, Concepción, Chile. pp. 29-48.

Roels S., Noceda S., Escalona M., Sandoval J., Canal M.J., Rodríguez R. y Debergh P. 2006. The effect of headspace renewal in a temporary immersion bioreactor on plantain (*Musa AAB*) shoot

proliferation and quality. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 84:155-163.

Rogalski M., Antunes de Moraes L., Felisbino C., Crestani L., Guerra M. y Lima da Silva. 2003. Acclimatization of micropropagated *Prunus* sp. rootstocks. *Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal* 25(2): 279-281.

Roustan J. P., Latche A. y Fallot J. 1989. Stimulation of *Daucus carota* somatic embryogenesis by inhibitors of ethylene synthesis: cobalt and nickel. *Plant Cell Reports* 8: 182-185.

Rugkhla A. y Jones M. 1998. Somatic embryogenesis and plantlet formation in *Santalum album* and *S. spicatum*. *Journal of experimental Botany* 49(320): 563-571.

Ruiz R., Rivero H., Alcalá V. y Espinosa M. 2004. Embriogénesis somática de *Eucalyptus grandis* hill ex maiden y *Eucalyptus urophylla* ST Blake. *Revista Chapingo. Serie Ciencias Forestales y del Ambiente* 10(2): 83-92.

Ryu N., Park K., Kim S., Yun H., Nam D., Lee S. y Ahn K. 2012. A hexane fraction of guava leaves (*Psidium guajava* L.) induces anticancer activity by suppressing akt/mammalian target of rapamycin/ribosomal p70 S6 kinase in human prostate cancer cells. *Journal of Medicinal Food* 15(3): 231-241.

Saha P., Bandyopadhyay S. y Raychaudhuri S. 2011. Formulation of nutrient medium for in vitro somatic embryo induction in *Plantago ovata* Forsk. *Biological Trace Element Research* 140(2): 225-243.

Salaj T., Blehová, A. y Salaj J. 2007. Embryogenic suspension cultures of *Pinus nigra* Arn.: growth parameters and maturation ability. *Acta Physiologiae Plantarum* 29(3): 225-231.

Samson J. 1986. Tropical fruits. Segunda edición. Tropical Agriculture Series, Longman Scientific and Technical, Longman Inc., New York. 335 p.

Samson N. P., Campa C., Le Gal L., Noirot M., Thomas G., Lokeswari T. S. y De Kochko, A. 2006. Effect of primary culture medium composition on high frequency somatic embryogenesis in different *Coffea* species. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 86(1): 37-45.

Sánchez F. O., Sánchez R. H. y Zabala M. A. 2002. Establecimiento de un cultivo de células en suspensión de *Eucalyptus cinerea*. Revista Colombiana de Biotecnología 4(1): 43-48.

Sankar-Thomas Y., Saare-Surminski K. y Lieberei R. 2008. Plant regeneration via somatic embryogenesis of *Camptotheca acuminata* in temporary immersion system (TIS). Plant Cell, Tissue Organ Culture 95(2): 163-173.

Sannasgala K. 1989. *In vitro* somatic embryogenesis in *Musa* spp. Thesis Ph.D., K. U. Leuven, Belgium. 172 p.

Segura J. 2008. Introducción al desarrollo. Concepto de hormona vegetal. En: Fundamentos de Fisiología Vegetal. Azcon-Bieto J. y Talón M. (Eds) 2º edición. Madrid, España. McGraw-Hill-Interamericana de España, S.A.U. pp. 349-376.

Shapiro S. y Wilk M. 1965. Variance test for normality. Biometrika 52:591-611.

Sharma P., Pandey S., Bhattacharya A. Nagar, P. Ahuja P. 2004. ABA associated biochemical changes during somatic embryo development in *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze. Journal Plant Physiology 161: 1269-1276.

Sharp W., Evans D., Ammirato P. y Yamada Y. 1983. Plant cell and tissue culture. Principles and Applications. Ohio State University Press. 892 p.

Shigeta J., Sato K. y Mii M. 1996. Effects of initial cell density, pH and dissolved oxygen on bioreactor production of carrot somatic embryos. Plant Science. 115: 109-114.

Shohael A., Khatun S., Alam M. y Paek K. 2013. Effects of Murashige and Skoog medium strength on germination and secondary metabolites production of *Eleutherococcus senticosus*'s somatic embryos in bioreactor. International Journal of Biosciences 3: 155-163.

Singh S., Meghwal P., Sharma H. y Singh S. 2002. Direct shoot organogenesis on hypocotyls explants from *in vitro* germinated seedlings of *Psidium guajava* L. cv. Allahabad Safeda. Scientia Horticulturae 95: 213-221.

Smertenko A. y Bozhkov P. 2014. Somatic embryogenesis: life and death processes during apical-basal patterning. Journal of Experimental Botany doi:10.1093/jxb/eru005.

Smith E., Gribaudo I., Roberts A. y Mottley J. 1992. Paclobutrazol and reduced humidity improve resistance to wilting of micropropagated grapevine. HortScience 27(2): 111-113.

Spomer L.A. y Smith M.A. 1996. Direct measurement of water availability in gelled plant tissue culture media. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 32:210-215.

Statistix 8. 2003. Statistix8: Analytical Software User's Manual. Tallahassee, Florida, U.S.A.

Stefanello S., Dal Vesco L.L., Ducroquet J. P., Nodari R. O. y Guerra M. P. 2005. Somatic embryogenesis from floral tissues of feijoa (*Feijoa sellowiana* Berg). Scientia Horticulturae 106: 117-126.

Steingroewer J., Bley T., Georgiev V. y Ivanov I. 2013. Bioprocessing of differentiated plant *in vitro* systems. Engineering in Life Sciences 13: 26-38.

Steinmacher D. A., Guerra M. P., Saare-Surminski K. y Lieberei R. 2011. A temporary immersion system improves *in vitro* regeneration of peach palm through secondary somatic embryogenesis. Annals of Botany 108(8): 1463-1475.

Steward F. 1969. Analysis of grow. Behavior of plants and their organs physiology. 5th edition. New York Academic press. New York. pp. 38-41.

Steward F., Mapes M. y Smith J. 1958. Growth and organized development of cultured cells. American Journal of Botany 45:693-704

Stuart D. A. y Strickland S. G. 1984. Embryogenesis from cell cultures of *Medicago sativa*. The role of aminoacid additions to the regeneration medium. Plant Science Letters 34:74-81.

Sytsma K. y Litt A. 2002. Tropical disjunctions in and among the *Myrtaceae* clade (*Myrtaceae*, *Heteropyxidaceae*, *Psiloxylaceae*, *Vochysiaceae*): Gondwanan vicariance or dispersal? (Abstract).

Botany 2002 Conference, University of Wisconsin, Madison, WS, USA. 67.

Szabados L., Mroginski L. A. y Roca W. M. 1991. Suspensiones celulares: descripción, manipulación y aplicaciones. En: Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones prácticas Roca W. y Mroginski L. (Eds) 1º edición. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Palmira Colombia. 173-210.

Tadeo F. y Gómez A. 2008 Fisiología de las plantas y el estrés. En: Fundamentos de Fisiología Vegetal. Azcon-Bieto J. y Talón M. (Eds) 2º edición. Madrid, España. McGraw-Hill-Interamericana de España, S.A.U. pp. 577- 598.

Tahardi J. S., Riyadi I. y Dodd W. A. 2003. Enhancement of somatic embryo development and plantlet recovery in *Camellia sinensis* by temporary liquid immersion. Jurnal Bioteknologi Pertanian 8(1): 1-7.

Termignoni R, Wang P. y Ching Y. 1996. Somatic embryo induction in *Eucalyptus dunnii*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 45:129-132.

Tisserat B. 1991. Embryogenesis, organogenesis and plant regeneration. En: Plant cell culture, a practical approach. Dixon R. A. (Eds). IRL Press Limited. pp. 79-105.

Tong F., Medina D. y Esparza D. 1991. Variabilidad en poblaciones de guayabo *Psidium guajava* L. del municipio Mara del estado Zulia. Revista de la Facultad de Agronomía (LUZ) 8(1): 15-27.

Tonon G., Berardi G., Rossi C., Bagnaresi U. 2001. Synchronized somatic embryo development in embryogenic suspensions of *Fraxinus angustifolia*. In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant 37: 462-465.

Trujillo S., Concepción L. y Nápoles B. 2004. Procedimiento para la micropropagación de *Psidium guajava* L. Centro de Bioplasmas, Universidad de Ciego de Ávila. Oficina Cubana de la Propiedad Industrial. República de Cuba. Numero de publicación CU 22916 A1

Vahdati K., Bayat S., Ebrahimzadeh H., Jariteh M. y Mirmasoumi M. 2008. Effect of exogenous ABA on somatic embryo maturation and germination in Persian walnut (*Juglans regia* L.). Plant Cell, Tissue and Organ Culture 93(2): 163-171.

Vasil I. 1994. Automation of plant propagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 39: 105-108.

Vasil V. y Vasil I.K. 1982. The ontogeny of somatic embryos of *Pennisetum americanum* (L.) Schum KI En: Cultured immature embryos. *Botanical gazette* 143: 454-465.

Vento Y. (Eds) 2011. Instructivo técnico para el cultivo de la guayaba. Instituto de Investigaciones en Fruticultura Tropical. Cuba. 44 p.

Vilchez J., Albany N., Gómez-Kosky R. Garcia L. y Agramonte D. 2001. Germinación de embriones somáticos de *Psidium guajava* L. cv. Enana Roja Cubana EEA-1840 en sistemas de inmersión temporal. *Biotecnología Vegetal* 1(2): 67-69.

Vilchez J., Albany N., Gómez-Kosky R. y García L. 2002. Inducción de embriogénesis somática en *Psidium guajava* L. a partir de embriones cigóticos. *Revista de la Facultad de Agronomía (LUZ)* 19(4): 284-293.

Vilchez J., Bracho I., Arenas N., Marín M. y Martínez L. 2004a. Respuesta a la técnica de acodo aéreo en plantas de guayabo (*Psidium guajava* L.) tolerantes al nematodo *Meloidogyne incognita*. *Revista de la Facultad de Agronomía (LUZ)* 21 Supl. 1: 22-27.

Vilchez, J., Albany, N., Gómez-Kosky, R., García, L. 2004b. Secondary embryogenesis and plant regeneration in *Psidium guajava* L. *Tropical Agricultural (Trinidad)* 81(1): 41-44.

Villalobos V., Thorpe T. y Roca W. 1991. Micropropagación: conceptos, metodología y resultados. En: Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones prácticas Roca W. y Mroginski L. (Eds) 1º edición. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Palmira Colombia. pp. 127-142.

Villar R., Ruiz J., Quero J., Poorter H., Valladares F. y Marañón, T. 2004. Tasas de crecimiento en especies leñosas: aspectos funcionales e implicaciones ecológicas. En: Ecología del bosque mediterráneo en un mundo cambiante. Valladares F. (Eds). 1º edición. Ministerio de Medio Ambiente, EGRAF, S. A., España, Madrid. pp. 191-227.

von Arnold S., Sabala I., Bozhkov P., Dyachok J. y Filonova L. 2002. Developmental pathways of somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 69: 233-249.

Wardle K., Dobbs E. y Short K. 1983. *In vitro* acclimatization of aseptically cultured plantlets to humidity. Journal of the American Society for Horticultural Science 108: 386-389.

Watt M. P. 2012. The status of temporary immersion system (TIS) technology for plant micropropagation. African Journal of Biotechnology 11: 14025-14035.

Watt M. P., Blakeway F. C., Termignoni R., y Jain S. M. 1999. Somatic embryogenesis in *Eucalyptus grandis* and *E. dunni*. En: Somatic embryogenesis in woody plants (Vol. 6). Jain S. M., Gupta P. K. y Newton R. (Eds) Springer Science & Business Media. pp. 63-78.

Wetherall D. F. y Dougall D. K. 1976. Sources of nitrogen supporting growth and embryogenesis in cultured wild carrot tissue. Plant Physiology 37:97-103.

Williams E. G. y Maheswaran G. 1986. Somatic embryogenesis: factors influencing coordinated behavior of cells as an embryogenic group. Annals of Botany 57: 443-462.

Wilson P., O'Brien M., Gadek P. y Quinn C. 2001. Myrtaceae revisited: A Reassessment of infrafamilial groups. American Journal of Botany 88(11): 2013-2025.

Witjaksono L. y Litz R.E. 1999. Induction and growth characteristics of embryogenic avocado cultures. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 58(1): 19-29.

Yadava U. L. 1996. Guava (*Psidium guajava* L.): an exotic tree fruit with potential in the southeastern United States. HortScience 31 (5): 789-794.

Young B. G., Jack D. L., Smith D. W. y Saier Jr. M.H., 1999. The amino acid/ auxin: proton symport permease family. Biochimica et Biophysica Acta 1415: 306-322.

Zavattieri M. A., Frederico A. M., Lima M., Sabino R. y Arnholdt-Schmitt B. 2010. Induction of somatic embryogenesis as an example of stress-related plant reactions. Electronic Journal of Biotechnology 13(1): 12-13.

Zegzouti R., Arnould M. F. y Favre J. M. 2001. Histological investigation of the multiplication step in secondary somatic

embryogenesis of *Quercus robur* L. Annals of Forest Science 58: 681–690.

Zhao Y., Sun W., Wang Y., Saxena P. K. y Liu C. Z. 2012. Improved mass multiplication of *Rhodiola crenulata* shoots using temporary immersion bioreactor with forced ventilation. Applied Biochemistry and Biotechnology 166(6): 1480-1490.

VIII. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Preparación del explante para la inducción de embriogénesis somática en guayabo cv. "Enana Roja Cubana EEA-1840".	46
Figura 2. Establecimiento de suspensiones celulares embriogénicas de guayabo cv. "Enana Roja Cubana EEA-1840".....	53
Figura 3. Fracción de agregados embriogénicos y embriones globulares >1000 μm , empleados para la multiplicación de suspensiones celulares embriogénicas de guayabo cv. "Enana Roja Cubana EEA-1840".	54
Figura 4. Aspecto general del material embriogénico utilizado para la etapa de maduración de embriones somáticos de guayabo cv. "Enana Roja Cubana EEA-1840".	56
Figura 5. Aspecto general de la germinación de embriones somáticos de guayabo cv. "Enana Roja Cubana EEA-1840" en sistema de inmersión temporal (RITA [®]).	60
Figura 6. Principales características morfológicas de los callos obtenidos durante la inducción de embriogénesis somática en embriones cigóticos inmaduros de guayabo cv. "Enana Roja Cubana EEA-1840".	71
Figura 7. Histología de la inducción de embriogénesis somática en guayabo cv. "Enana Roja Cubana EEA-1840".....	73
Figura 8. Principales características morfológicas de los callos obtenidos durante la inducción de embriogénesis somática en embriones cigóticos inmaduros de guayabo cv. "Enana Roja Cubana EEA-1840" con diferentes medios de cultivo y concentraciones de sacarosa.	75
Figura 9. Principales características morfológicas de los callos obtenidos durante la fase de proliferación o de embriogénesis secundaria en guayabo cv. "Enana Roja Cubana EEA-1840".....	79
Figura 10. Histología de la fase de proliferación o embriogénesis somática recurrente en guayabo cv. "Enana Roja Cubana EEA-1840" en medio de cultivo MS suplementado con 1 mg.L^{-1} de	

2,4-D, 400 mg.L⁻¹ de L-glutamina, 100 mg.L⁻¹ de ácido ascórbico, 60 g.L⁻¹ de sacarosa y gelificado con 2,4 g.L⁻¹ de Phytigel® 84

Figura 11. Establecimiento de suspensiones celulares embriogénicas de guayabo cv. "Enana Roja Cubana EEA-1840"..... 85

Figura 12. VCS en cultivos embriogénicos de guayabo cv. "Enana Roja Cubana EEA-1840", en medios líquidos MS y WPM en agitación. 86

Figura 13. VC en cultivos embriogénicos de guayabo cv. "Enana Roja Cubana EEA-1840", en medios líquidos MS y WPM en agitación. 87

Figura 14. Contenido de sacarosa en cultivos embriogénicos de guayabo cv. "Enana Roja Cubana EEA-1840", en medios líquidos MS y WPM en agitación. 87

Figura 15. Efecto de la densidad de celular en la dinámica de crecimiento de suspensiones celulares embriogénicas de guayabo cv. "Enana Roja Cubana EEA-1840". 89

Figura 16. Características generales de suspensiones celulares embriogénicas de guayabo cv. "Enana Roja Cubana EEA-1840"..... 90

Figura 17. Contenido de sacarosa del medio de cultivo de tres densidades celulares en suspensiones celulares embriogénicas de guayabo cv. "Enana Roja Cubana EEA-1840"..... 91

Figura 18. Maduración de embriones somáticos de guayabo cv. "Enana Roja Cubana EEA-1840". 96

Figura 19. Aspecto general de la germinación de embriones somáticos de guayabo cv. "Enana Roja Cubana EEA-1840"..... 97

Figura 20. Tendencias ajustadas de la acumulación de peso seco en plántulas y vitroplantas micropropagadas de guayabo cv. "Enana Roja Cubana EEA-1840" 109

Figura 21. Tendencias ajustadas de la tasa de crecimiento del cultivo (TCC) en plántulas y vitroplantas micropropagadas de guayabo cv. "Enana Roja Cubana EEA-1840"..... 111

Figura 22. Vista general del crecimiento de vitroplantas micropropagadas de guayabo cv. "Enana Roja Cubana EEA-1840". 112

Figura 23. Tendencias ajustadas del índice de crecimiento relativo (ICR) en plántulas y vitroplantas micropropagación de guayabo cv. "Enana Roja Cubana EEA-1840". 113

Figura 24. Tendencias ajustadas de la tasa de asimilación neta (TAN) en plántulas y vitroplantas micropropagadas de guayabo cv. Enana "Roja Cubana EEA-1840". 115

IX. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Efecto de la auxina sobre la inducción de embriogénesis somática en guayabo cv. "Enana Roja Cubana EEA-1840" a partir de embriones cigóticos inmaduros.	67
Tabla 2. Efecto del medio de cultivo y la concentración de sacarosa sobre el porcentaje de formación de callo, callo embriogénico y masas pro-embriogénicas, en la inducción de embriogénesis somática en guayabo cv. "Enana Roja Cubana EEA-1840".	74
Tabla 3. Efecto de la combinación de 2,4-D y L-glutamina sobre el número total de embriones somáticos, número de embriones en etapa globular, torpedo y cotiledonar, en fase de embriogénesis secundaria de guayabo cv. "Enana Roja Cubana EEA-1840".	80
Tabla 4. Efecto de la densidad de cultivo estimada como VCS sobre el peso fresco, peso seco, porcentaje de humedad y de materia seca de suspensiones celulares embriogénicas de guayabo cv. "Enana Roja Cubana". Datos tomados a los 49 días de cultivo.	93
Tabla 5. Efecto del ABA sobre la maduración de embriones somáticos de guayabo cv. "Enana Roja Cubana EEA-1840".	94
Tabla 6. Efecto de la concentración del medio de cultivo MS sobre la germinación de los embriones somáticos de guayabo cv. "Enana Roja Cubana EEA-1840".	98
Tabla 7. Efecto de la concentración de sacarosa sobre la germinación de los embriones somáticos de guayabo cv. "Enana Roja Cubana EEA-1840".	98
Tabla 8. Comparación de la germinación de embriones somático de guayabo cv. "Enana Roja Cubana EEA-1840" en medio semisólido y en recipiente de inmersión temporal (RITA®).	100
Tabla 9. Efecto de la combinación tiempo y frecuencia de inmersión sobre la germinación de embriones somáticos de guayabo cv. "Enana Roja Cubana EEA-1840" en recipiente de inmersión temporal (RITA®).	102

Tabla 10. Efecto de la combinación del tiempo y frecuencia de inmersión sobre el consumo de sacarosa, sales minerales y pH en la germinación de embriones somáticos de guayabo cv. "Enana Roja Cubana EEA-1840" en recipiente de inmersión temporal (RITA®).	104
Tabla 11. Efecto de la densidad de inóculo inicial de embriones somáticos de guayabo cv. "Enana Roja Cubana EEA-1840", sobre la germinación, en recipiente de inmersión temporal (RITA®).....	104
Tabla 12. Efecto de la densidad de inóculo inicial de embriones somáticos sobre el consumo de sacarosa, sales minerales y pH del medio de cultivo, en la germinación de embriones somáticos de guayabo cv. "Enana Roja Cubana EEA-1840" en recipiente de inmersión temporal (RITA®).....	105
Tabla 13. Germinación de embriones somáticos de guayabo cv. "Enana Roja Cubana EEA-1840" en recipientes de inmersión temporal automatizados (RITA®), envases de cultivo con ventilación forzada (ECCVF) y envases de cultivo sin ventilación forzada (ECSVF).....	107
Tabla 14. Comparación del crecimiento en vivero entre plántulas y vitroplantas de guayabo cv. "Enana Roja Cubana EEA-1840" provenientes de la micropropagación y de semilla.	115

X. LISTADO DE ABREVIATURAS

2,4-D:	ácido diclorofenoxiacético
6-BAP:	benciladenina 3-Bencil-3H-purina-6-amina
ABA:	ácido abscísico
ADN:	ácido desoxirribonucleico
AF:	área foliar
ANADEVA:	análisis de la varianza
B5:	medio de cultivo, formulación de Gamborg <i>et al.</i> (1968)
CESID:	Centro Socialista de Investigación y Desarrollo
CIRAD:	Centre de Coopèration Internationale en Reserche Agronomique pour le Dèveloppement.
CORPOZULIA:	Corporación para el Desarrollo de la Región Zuliana
cv.:	cultivar
ddt:	días después del trasplante
DI-31:	análogo de brasinoesteroide $C_{27}H_{42}O_5$, equivalente al Biobras-16
Dicamba:	ácido 3,6-dicloro-2-methoxibenzoico
ECCVF:	envase de vidrio con ventilación forzada
ECSVF:	envases de vidrio sin ventilación forzada
FAA:	solución formalina-ácido acético-alcohol etílico
HERZU:	herbario de la Universidad del Zulia
ICR:	índice de crecimiento relativo
LSD:	siglas en el idioma inglés (Least significant difference) para la prueba de mínima diferencia significativa entre medias
MS:	medio de cultivo, formulación Murashige y Skoog (1962)

°Bx:	grados Brix o porcentaje de sacarosa por cada 100 mL de solución
Picloram:	ácido 4-amino-3,5,6-tricloro-2-piridincarboxílico
PSI:	siglas en el idioma inglés (pounds-force per square inch) para libras por pulgada cuadrada.
PTFE:	politetrafluoroetileno o teflón
r.p.m.:	revoluciones por minuto
RITA [®] :	Recipiente de inmersión temporal automatizado, CIRAD-Francia
TAN:	tasa de asimilación neta
TCC:	tasa de crecimiento del cultivo
VCS:	volumen de células sedimentadas
WPM:	medio de cultivo, formulación Woody Plant Medium, de McCown y Lloyd, 1981